

**AUTOMATISIERUNG DER BESTIMMUNG
DER BINDUNG VON CORTISOL AN
SERUMPROTEINE UND DES GESAMT-CORTISOLS
IM SERUM (COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-
ANALYSE)**

Johann Braun

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0009

AUTOMATISIERUNG DER BESTIMMUNG DER BINDUNG VON
CORTISOL AN SERUMPROTEINE UND DES GESAMT-CORTISOLS
IM SERUM (COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-ANALYSE)*

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Johann Braun

aus

Pleystein

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. P.C.Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. E.Buchborn
Dekan:	Prof. Dr.med. W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.1974	

MEINEN ELTERN

Zu danken habe ich

Herrn Professor Dr.med. P.C.Scriba für die freundliche Überlassung des Themas und die Förderung, die er mir und dieser Arbeit gewährte,

Herrn Dr.med. O.A.Müller für die Betreuung und die unermüdliche Unterstützung,

Herrn Dr.med. K.Horn und Herrn Henner für den Rat in technischen Fragen,

Fräulein R. Fröhlich für die gewissenhafte Assistenz bei zahlreichen Versuchen,

Fräulein F.Haag für die Hilfe beim Anfertigen der Abbildungen,

sowie den übrigen Doktoranden und Angestellten für die angenehme Zusammenarbeit.

I N H A L T

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>^3H-CORTISOL-UPTAKE TEST</u>	
	<u>("SOGENANNTES FREIES ^3H-CORTISOL")</u>	<u>6</u>
2.1	Prinzip	6
2.2	Methodik	6
2.2.1	Gewinnung und Aufbewahrung des zu untersuchenden Serums	6
2.2.1.1	Nachwaschserum	7
2.2.2	Radioaktiver Arbeitsstandard	7
2.2.3	Sephadex Gelfiltration	8
2.2.3.1	Präparation der Säulen	8
2.2.3.2	Zur Theorie der Gelfiltration (22,31)	9
2.2.4	Inkubationsgemisch (IKG)	10
2.2.4.1	Volumina und Inkubationszeit	10
2.2.4.2	Auftragen des Inkubationsgemisches und Elution	10
2.2.5	Sammeln der Eluate	11
2.2.5.1	Chromatopart-Technik	11
2.2.5.2	Batch-Technik	11
2.2.6	Flüssigkeitsscintillationsspektrometrie	11
2.2.6.1	Aufbereitung der Proben	11
2.2.6.2	Messung der Proben	12
2.2.6.3	Quenchkorrektur und Berechnung der Ausbeute (71)	12
2.3	Interpretation der Elutionsprofile Einfluß der verschiedenen Gel-Arten	14
2.3.1	Proteinfreie Inkubationsgemische	14
2.3.2	Proteinhaltige Inkubationsgemische	15
2.4	Faktoren, die die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes beeinflussen	18
2.4.1	Temperatur	18

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
2.4.2	Verdünnung der Probe 18
2.4.3	Säulenvolumen 20
2.4.4	Elutionsgeschwindigkeit 20
2.4.5	Elutionsmittel 20
2.5	Automatisierung 23
2.6	Ergebnisse 25
2.6.1	9 ⁰⁰ Uhr-Nüchternwerte 25
2.6.1.1	Normalpersonen 25
2.6.1.2	Patienten mit primärer oder sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz 25
2.6.1.2.1	Primäre Nebennierenrindeninsuffizienz 25
2.6.1.2.2	Sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienzen 25
2.6.1.3	Gravide Patientinnen bzw. Anti- ovulantien- und Östrogentherapie 26
2.6.1.4	Patienten mit Cushing-Syndrom 26
2.6.2	Stimulationsteste und Suppressionsteste 26
2.6.2.1	Intravenöser ACTH-Belastungstest 26
2.6.2.1.1	Normalpersonen 26
2.6.2.1.2	ACTH-Belastungstest bei Patienten mit primärer NNR-Insuffizienz und bei Pa- tienten mit Hypophysentumoren 28
2.6.2.2	Dexamethason-Suppressionstest 28
2.6.2.2.1	Normalpersonen 28
2.6.2.2.2	Patienten mit Verdacht auf ein Cushing-Syndrom 28
<u>3</u>	<u>COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-ANALYSE</u>
	<u>(CPBA) FÜR PLASMACORTISOL</u> 31
3.1	Prinzip 31
3.2	Methodik 32
3.2.1	Extraktion des Cortisols aus dem Serum 32
3.2.2	Kalte Hormonstandards 33
3.2.3	Spezifisches Reagens 33

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
3.2.3.1	Gewinnung des CBG-Serums	33
3.2.3.2	Wiederaufnehmen der eingedampften Proben	34
3.2.4	Trennung der proteingebundenen und der freien Fraktion	34
3.2.5	Eichkurve	34
3.2.6	Spezifität der CPBA	36
3.3	Trennung von Steroiden über eine Sephadex LH-20-Säule	38
<u>4</u>	<u>COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-ANALYSE (CPBA) FÜR PLASMACORTISOL OHNE EXTRAKTION MIT ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN</u>	
		41
4.1	Vorversuche	41
4.2	Prinzip	45
4.3	Methodik	46
4.3.1	Durchführung	46
4.3.2	Eichkurve	47
4.3.3	Spezifität	50
4.3.4	Wiederverwendbarkeit der Säulen	53
4.4	Qualitätskontrolle	54
4.4.1	Sensitivität (Empfindlichkeit)	54
4.4.2	Präzision (Genauigkeit)	54
4.4.3	Wiederfinderversuch (Richtigkeit)	54
4.5	Ergebnisse	55
4.5.1	9 ⁰⁰ Uhr-Nüchternwerte Normalpersonen	55
4.5.2	ACTH-Belastungstest bei Normalpersonen ACTH-Kurztest	55
4.5.3	Dexamethason Suppressionstest Normalpersonen	59
4.5.4	Beurteilung	59

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	61
5.1	Sogenanntes freies ^3H -Cortisol	61
5.2	Competitive Proteinbindungs-Analyse	68
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	74
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	76

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

cm	Zentimeter
g, mg, μ g, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
sec	Sekunde
min	Minute
l, ml	Liter, Milliliter
Ci, mCi, μ Ci	Curie, Millicurie, Mikrocurie
^3H	Tritium
CPM	Counts pro Minute
DPM	Desintegrationen pro Minute
S.A.	Spezifische Aktivität
M	molar
N	normal
Mol, mMol	Mol, Millimol
IKG	Inkubationsgemisch
CBG	Corticosteroid-binding-globulin
NWS	Nachwaschserum
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
HSA	Humanserumalbumin
F	Cortisol
U	Umdrehungen
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung
Vk	Variationskoeffizient

LISTE DER PRÄPARATE

Sephadex G-10, G-15, G-25 superfine, G-50 superfine,
G-75 superfine, LH-20 (Pharmacia, Uppsala,
Schweden).

Cortisol-1, 2-³H, S.A. 30 Ci/mMol

Corticosteron-1, 2-³H, S.A. 30 Ci/mMol

Progesteron-1, 2-³H, S.A. 41 Ci/mMol

17 α -Hydroxyprogesteron, 7 α -³H, S.A. 15 Ci/mMol

(The Radiochemical Centre, Amersham, England)

17 α -Hydroxydesoxycorticosteron-1, 2-³H, S.A. 35 Ci/mMol

(New England Nuclear, Dreieichenhain)

Cortisol (11 β , 17 α , 21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion)

Corticosteron (11 β , 21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion)

Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion)

17 α -Hydroxyprogesteron (17 α -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion)

11-Desoxycortisol (17 α , 21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion)

Testosteron (17 β -Hydroxyandrost-4-en-3-on)

Östradiol (Östra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol)

Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxyandrost-5-en-17-on)

(Merck AG., Darmstadt)

Insta-Gel (Packard Instruments, Frankfurt)

PPO (2,5-Diphenyloxazol) (Packard Instruments, Frankfurt)

Dimethyl-POPOP (Packard Instruments, Frankfurt)

Toluol-³H (Packard Instruments, Frankfurt)

Alle übrigen benutzten Präparate waren p.a.-Präparate der
Merck AG., Darmstadt.

1 EINLEITUNG

Steroide werden im menschlichen Serum, ähnlich wie andere niedermolekulare Stoffe (8), an Proteine gebunden (10). Diese Kenntnis wurde 1956 von DAUGHADAY und BUSH durch die Entdeckung eines spezifischen Proteins, das Corticosteroide mit hoher Affinität aber geringer Kapazität binden kann, erheblich erweitert. Es wird CBG (Corticosteroid-binding-globulin) genannt und unterscheidet sich wesentlich in seinem Verhalten vom Albumin (HSA), dessen Ligandenspezifität gering, dessen Kapazität dagegen groß ist (12,13,14,15).

BLAUENHITZ und ANTONIADES fanden unabhängig von DAUGHADAY die Existenz eines Proteins mit hoher Bindungsaffinität für Corticosteroide, das sie Transcortin nannten (1,81). Heute werden beide Begriffe synonym verwandt, nachdem sich gezeigt hatte, daß das CBG und das Transcortin identisch sind (83).

WETTPHAL bestimmte das Molekulargewicht des CBG mit Hilfe des Sedimentationskoeffizienten und des Diffusionskoeffizienten auf 51 700. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Werten von LKAL und LOK überein, die ein Molekulargewicht von 52 000 angaben (54,79).

Bei der elektrophoretischen Auftrennung des Humanserums wandert das CBG in Bereich der α_1 -Globulinfraktion (16), die Elektrophoretik zeigt einen Anteil von 56 % für die Polypeptide, was in guter Übereinstimmung mit dem gemessenen Kohlenhydratanteil von 26 % steht. Inzwischen ist auch der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäuren am Aufbau des Moleküls bekannt (53,77).

Gleichzeitig wurden Überlegungen angestellt, welche Funktionen dem Transcortin (CBG) eigentlich zukommt. Die

Löslichkeit der Steroide ist bei physiologischen Konzentrationen ausreichend und bedürfte nicht der Anwesenheit von spezifischen Proteinen als Lösungsvermittler (3).

Unter dem Eindruck kinetischer Experimente wurde der reversiblen Bindung eine fundamentale Bedeutung bei der Regulation, dem Transport und der Ausscheidung zugeordnet. Nur der geringe Teil der nicht an Proteine gebundenen Corticosteroide hat biologische Aktivität (44,47,82). Während im Serum bei Körpertemperatur 90 % des Plasmacortisols an CBG gebunden werden (6,20,51), liegt in der Lymphe, die weit weniger CBG enthält, der größte Teil der Corticosteroide in freier Form vor. Ähnliche Verhältnisse finden sich im Liquor, wo ungefähr 90 % des Cortisols frei sind (43). Es wird angenommen (73), daß im extrazellulären Raum ein Gleichgewicht zwischen der Bindung von Cortisol an Transcortin einerseits und an besondere Zellstrukturen andererseits besteht.

Die Bindung des Cortisols an die Plasmaproteine verhindert die Ausscheidung des größten Teils durch die Niere, denn nur das ungebundene Cortisol kann in das tubuläre Lumen filtriert werden. Der Verlust von Cortisol wird durch tubuläre Reabsorption weiter vermindert. Die renale Clearance des freien Plasmacortisols beträgt 40 - 50 ml/min (43).

Neben der Puffer- oder Reservoirfunktion (17) könnte die reversible Bindung aber auch eine wesentlich aktivere Rolle haben, etwa beim Transport des Hormons in das Zielorgan oder beim Austritt des Steroids aus dem endokrinen Organ. Insgesamt ist die Funktion des CBG noch nicht endgültig und vollständig geklärt.

Für andere Klassen außer den Vertebraten ist im Augenblick erst wenig über steroidbindende Globuline bekannt. In einer umfassenden Studie an über 200 Species aus der

Klasse der Vertebraten konnten SEAL und DOE sowie STEENO und DE MOOR zeigen, daß bindende Globuline bei jeder Species vorhanden sind, aber die Menge der gebundenen Steroide erheblich schwankt. Trotzdem glaubten sie, einen aufsteigenden Trend für den Transcortingehalt von den Fischen bis zu den Säugern zu erkennen (78,86).

Das CBG war im Anschluß an seine Entdeckung das erste spezifische Protein, dessen Bindungskapazität, dessen Assoziationskonstanten und dessen Konzentration im menschlichen Serum untersucht wurden (18,32).

Durch diese Untersuchungen wurde auch bekannt, daß der CBG-Gehalt im menschlichen Serum nicht immer gleich groß ist. So wurde bei Patientinnen unter Antioovulantientherapie oder in der späten Schwangerschaft deutlich erhöhte Werte gemessen. Daneben wurden isolierte Vermehrungen oder Verminderungen gefunden, deren familiäre Häufung und damit Erblichkeit noch diskutiert wird (25).

Solche veränderten CBG-Spiegel führen dann zu hohen oder niederen Ergebnissen bei der Bestimmung des Gesamtcortisols, während die Patienten nie das Bild eines Addison-Syndroms oder eines Cushing-Syndroms zeigen, da die Regulation der Cortisolsekretion offenbar nur über das nicht an Proteine gebundene Cortisol erfolgt, während der an Proteine gebundene Anteil biologisch inaktiv ist.

Es ist also wichtig, zusätzlich zur Gesamthormonbestimmung ein Maß für diesen freien Anteil zu haben, um nicht zu Fehlinterpretationen von Gesamthormonspiegeln zu kommen.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es deshalb, eine Methode zu erarbeiten, die es erlaubt, Aussagen über die Größe dieses freien Anteils zu machen. Das Prinzip

einer solchen Methode muß darin bestehen, den protein-gebundenen und den freien Anteil zu trennen.

Grundsätzlich stehen heute zwei Gruppen von Techniken für die Trennung von proteingebundenem und freiem Hormon zur Verfügung:

- a) Techniken, bei denen das Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Hormon während der Trennung aufrechterhalten wird, wie z.B. bei der klassischen Gleichgewichtsdialyse (74), dem batchweisen Zusatz von Sephadex zum Reaktionsansatz (PEARLMAN und CREPY) (68) und der Ultrafiltration (87). Alle diese Methoden sind relativ aufwendig.
- b) Techniken, bei denen zwar das Gleichgewicht während der Trennung nicht aufrechterhalten wird, wie z.B. bei der Säulenchromatographie (19) und den Adsorbentienmethoden (34), die aber dennoch ein Maß für den tatsächlich freien Anteil des Hormons sind.

Die heute am weitesten verbreitete Methode dieser Art ist die Adsorption des freien Cortisols an unlösliche Partikel, wie z.B. an Fuller's earth und Lloyds reagent (59), an Dextran coated charcoal (67) und an Polystyrene. Bei allen Adsorbentienmethoden ist die Reaktionszeit ein kritischer Faktor, da die Reaktion zwischen dem Adsorbens und dem Steroid im wesentlichen eine irreversible Reaktion ist.

Welches Verfahren nun angewandt wird, ist eine Frage der experimentellen Möglichkeiten und der erwarteten Information.

Wir haben bei Berücksichtigung früherer Ergebnisse aus unserer Klinik (35) und unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Automatisierung der Methode die Säulenchromatographie mit Dextrangelen als Trennverfahren gewählt.

MURPHY hatte bereits im Jahre 1961 für die Untersuchung der CBG-Konzentrationen bei Leberzirrhosen die Versuche von DAUGHADAY wiederholt und dabei erkannt, daß die Verdrängung radioaktiv markierten Cortisols aus der Bindung an CBG durch kaltes zugesetztes Cortisol eine Kurve ergab, die als Eichkurve für das kalte Cortisol verwendet werden konnte (56,57). Damit war die Grundlage geschaffen für eine Methode, die sie Competitive Protein - Binding-Analysis (CPBA) nannte, und die große Ähnlichkeit mit dem von BERSON und YALOW kurze Zeit vorher beschriebenen Radioimmunoassay für Insulin hatte (91). Seit dieser Zeit wird dieses Prinzip mit großem Erfolg und in großem Umfang für die Bestimmung nahezu aller Steroide in biologischen Flüssigkeiten verwandt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit haben wir, gestützt auf die Versuche mit proteinfreien Inkubationsgemischen (s.2.3.2), eine CPBA (Competitive Proteinbindungs-Analyse) für Plasmacortisol entwickelt.

Unter Ausnützung der reversiblen Adsorption des Cortisols an Dextrangel gelang es, den bisher üblichen Extraktionsschritt mit organischen Lösungsmitteln zu vermeiden. Vielmehr wurde das Cortisol auf der Dextrangelsäule aus seinen Plasmaproteinbindungen freigesetzt und auf der gleichen Säule die Competitive Proteinbindungs-Analyse durchgeführt.

Diese wesentliche Vereinfachung der Methode machte eine Automatisierung möglich.

2 ^3H -CORTISOL-UPTAKE TEST

("SOGENANNTES FREIES ^3H -CORTISOL")

2.1 Prinzip

Für eine Aussage über den nicht proteingebundenen - und damit biologisch aktiven - Hormonanteil im Serum (s. EINLEITUNG) wird proteingebundenes und freies Cortisol durch Säulenchromatographie über Dextrangelsäulen voneinander getrennt. Dafür wird dem zu untersuchenden Serum eine konstante Menge ^3H -Cortisol als radioaktiver Tracer zugesetzt. Dieses verteilt sich auf die protein-gebundene und die nicht proteingebundene Fraktion entsprechend dem Verhältnis aus endogenem Cortisolspiegel und Cortisol bindenden Proteinen, vor allem dem CBG. Der gemessene, nicht gebundene ^3H -Cortisolanteil in Prozent der Gesamtaktivität wird als das "sogenannte freie ^3H -Cortisol" bezeichnet; "sogenannt" deshalb, weil er nicht den wahren prozentualen Anteil des freien Cortisols am Gesamtcortisol im Serum angibt, sondern in seiner Höhe wesentlich von den experimentellen Bedingungen wie z.B. Temperatur, Säulengröße, Gel-Art und anderen Faktoren abhängt. Es ist deshalb notwendig, beim Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Methoden die experimentellen Bedingungen zu kennen und die Unterschiede zu berücksichtigen (s. 2.3.2 und 2.4).

2.2 Methodik

2.2.1 Gewinnung und Aufbewahrung des zu untersuchenden Serums

Die Blutentnahme erfolgte für den Nüchternwert wegen der circadianen Periodik der Cortisolsekretion (7,26,45,50,70) um 9 Uhr vormittags, sonst entsprechend den zeitli-

chen Vorschriften der in der Klinik durchgeführten Suppressions- und Stimulationsteste (s. 2.6.2). Nach der Venenpunktion wurde das Blut ohne Aspiration in Plastikgefäßen aufgefangen und anschließend bei ca. 3000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde dekantiert und in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt. Es wurde darauf geachtet, daß das zu untersuchende Serum nicht mehrmals aufgetaut und eingefroren wurde. Einmaliges Einfrieren hat keinen Einfluß auf die Bindungsverhältnisse (55).

2.2.1.1 Nachwaschserum

Die Reste der bei den Routinebestimmungen der klinischen Chemie angefallenen Seren wurden gepoolt und bei -20°C aufbewahrt. Diesem Mischserum wurde nach dem Auftauen 1 g Florisil (Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg) pro 100 ml Serum zur Entfernung der meisten Steroide zugesetzt. Dann wurde es bei Zimmertemperatur einige Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Wir verdünnten dieses Serum 1 ad 4 und verwandten es vor allem bei der CPBA zur Abkürzung der Elution des freien*Anteils (s. 4.1 und 4.3.1)

2.2.2 Radioaktiver Arbeitsstandard

Verwandt wurde als radioaktiver Tracer Cortisol-1, 2, $-^3\text{H}$ Code TRK 133 (Fa. Radiochemical Center, Amersham, England) gelöst in Benzol:Äthanol (9:1) (V/V).

0,25 ml dieses Präparates wurden unter Zusatz von 20 ml Äthanol absolut mit sterilem aqua bidest. ad 500 ml ver-

* Der Begriff "frei" sollte, obwohl er noch bei Proteinbindungsstudien verwendet wird, durch "ungebunden" ersetzt werden, um Mißverständnisse bei der Abgrenzung der unkongjugierten Form ("frei") zu vermeiden (89).

dünnt. Dieser radioaktive Arbeitsstandard wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die spezifische Aktivität war größer als 30 Ci/mMol .

2.2.3 Sephadex Gelfiltration

Sephadex ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. Der Vernetzungsgrad und die Porengröße verhalten sich umgekehrt proportional zueinander. Im Gegensatz zu Ionenaustauschern fehlen polare Gruppen. Durch zahlreiche Hydroxylgruppen sind die Dextrangele jedoch gut mit Wasser quellbar. Die einzelnen Gele unterscheiden sich in ihrem Quellverhalten und werden nach dem Quellgrad in Wasser typisiert.

2.2.3.1 Präparation der Säule

Als Säulen dienten die Zylinder der Einmalspritzen aus Plastik (Fa. Braun, Melsungen) mit dem Volumen 5 ml. Die zentrale Ausflußöffnung wurde mit einem Scheibchen feiner ausgestanzter Glasmatte und einem Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen) abgedeckt.

Für die Chromatographie wurde das Dextrangel Sephadex G-50 superfine der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden (in der BRD: Fa. Deutsche Pharmacia GmbH, 6 Frankfurt/Main 1) verwandt.

Als Trockensubstanz wurden $0,7 \text{ g}$ abgewogen und mit reichlichem Überschuß an destilliertem Wasser über Nacht gequellt. Die Flüssigkeit über den gequollenen Gelen wurde abgegossen, die Gele mit etwas Wasser wieder aufgeschlemmt und in die vorbereiteten Säulen gefüllt. Zur Stabilisierung der Geloberfläche wurde ein Membranfilter schwach aufgedrückt.

2.2.3.2 Zur Theorie der Gelfiltration (22,31)

In einer präparierten Säule können zwei Phasen unterschieden werden:

1. Das von der Gesamtheit der Gelpartikel umschlossene innere Volumen V_i
2. Das die Gelpartikel umgebende äußere Volumen V_a

In ihrer Summe bilden sie das Gesamtvolumen der Säule.

Abhängig von der Porengröße der Gelpartikel, werden bestimmte Substanzen in das Innere der Gelmatrix eindringen können, andere, deren Molekulargewicht oberhalb einer gewissen Größe liegt, die als Ausschlußgrenze bezeichnet wird, werden nur das äußere Volumen benutzen können.

Für die Verhältnisse des idealen Molekularsiebs berechnet sich das Elutionsvolumen V_e aus dem inneren und dem äußeren Volumen und aus dem Verteilungskoeffizienten k einer Substanz zwischen den beiden Volumina:

$$V_e = V_a + k \cdot V_i$$

$k = 1$: für Moleküle, deren Molekulargewicht unterhalb der Ausschlußgrenze liegt,

$k = 0$: für Moleküle, deren Molekulargewicht oberhalb der Ausschlußgrenze liegt.

Leider gelten die Bedingungen des idealen Molekülsiebs nur angenähert, denn ein Teil des inneren Volumens ist als Hydratationswasser fest an die Gelmatrix angelagert und steht nicht den gelösten Molekülen zur Verfügung. Für den Verteilungskoeffizienten gilt dann:

$$0 < k < 1$$

Häufig treten Wechselwirkungen zwischen dem Gel und den zu trennenden Molekülen auf. Dadurch kommt es zu einer Verzögerung der Elution dieser Moleküle. Der Verteilungskoeffizient wird größer als eins. Man spricht dann von reversibler Adsorption.

2.2.4 Inkubationsgemisch (IKG)

2.2.4.1 Volumina und Inkubationszeit

Wenn nicht anders angegeben, wurden 0,2 ml des zu untersuchenden Serums und 0,2 ml des radioaktiven Arbeitsstandards mit Mikroliterpipetten (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmischer inkubiert. Bei einer spezifischen Aktivität von 34 Ci/mMol betrug die im Reaktionsgemisch vorhandene Aktivität 0,1 μ Ci und die Menge des mit dem radioaktiven Standard zugefügten Cortisols ca. 1 ng.

Die Zeit, die für die Äquilibration notwendig ist, liegt nach den Angaben von MURPHY bei einer Temperatur von 10°C bei weniger als 5 min (58). Es reicht also die Inkubation in 15 Minuten bei Zimmertemperatur auf jeden Fall aus.

2.2.4.2 Auftragen des Inkubationsgemisches und Elution

Vor der Verwendung wurden die Säulen durch zirkulierendes Wasser aus einem auf 26°C eingestellten Wasserbad temperiert. Gleichzeitig wurde mit einer Mikropumpe (Fa. Ismatec, Zürich, Schweiz) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 durch die Säule gepumpt, um die Säule auf pH 8,0 zu äquilibrieren. Dann wurde das Inkubationsgemisch

30 sec lang aus dem Reaktionsgefäß angesaugt. Die Elution erfolgte mit dem oben angegebenen Puffer.

2.2.5 Sammeln der Eluate

Es wurden zwei verschiedene Methoden entsprechend der gewünschten Information verwandt.

2.2.5.1 Chromatopart-Technik

Nach Beginn der Elution wurden in Abständen von 1 min die Elutionsgefäße entweder mit der Hand oder von einem automatischen Probensammler gewechselt. Mit dieser Fraktionierungstechnik wurde die zeitliche Abhängigkeit im Elutionsverhalten untersucht.

2.2.5.2 Batch-Technik

Mit Hilfe des durch die Chromatopart-Technik erhaltenen Elutionsprofils wurde ein Zeitplan erstellt, der über die Dauer Auskunft gab, während der das Eluat ungeteilt gesammelt wurde. Im wesentlichen unterschieden wir neben einem Vorlauf, der verworfen wurde, den ersten Batch, der dem proteingebundenen Anteil und einen zweiten Batch, der dem freien Anteil ("sogenanntes freies ^3H -Cortisol") entsprach.

2.2.6 Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie

2.2.6.1 Aufbereitung der Proben

Die Eluate wurden direkt in Plastic Liquid Scintillation vials (Fa. NEN Chemicals, Dreieichenhain) gesammelt und mit 10 ml Insta-Gel (Fa. Packard, Frankfurt) versetzt. Die Proben wurden zur besseren Durchmischung gründlich geschüttelt und bei $+4^{\circ}\text{C}$ ca. 30 min lang gekühlt.

Durch die Verwendung von Insta-Gel konnten die wässrigen Proben direkt gezählt werden. Die zeitraubende und mit Fehlern verbundene Extraktion mit Dichlormethan und das Eindampfen zur Trockne, wie es für die Anwendung herkömmlicher Scintillationsgemische auf Toluolbasis ohne Emulgatoren notwendig war, konnte damit vermieden werden.

2.2.6.2 Messung der Proben

Die Messung erfolgte als Flüssigkeitsscintillations-spectrometrie im Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer System Modell 3324 (Fa. Packard, Illinois, USA). Einstellung des Gerätes: Gain 55 %, Window 50 - 1000, time preset 1 min.

Der statistische Fehler in % bei der Zählung (f) berechnet sich nach der Formel: (N = die Anzahl der gezählten Impulse)

$$\frac{1}{\sqrt{N}} \cdot 100 = f$$

Er lag in der Größenordnung von 1 - 2 %.

2.2.6.3 Quenchkorrektur und Berechnung der Ausbeute (71)

Ein wichtiges Problem bei der Flüssigkeitsscintillationsmessung ist der Quench. Das ist jener Effekt, der - gleich welcher Ursache - zu einer Verminderung der Photonenproduktion oder zu einer Verminderung der Photonenemission führt.

Allgemein werden zwei Mechanismen für den Quench unterschieden: der chemische Quench und der Farbquench. Vor allem Substanzen, die in Lösung gelb (z.B. Serum) gefärbt sind, stören durch Absorption des emittierten Lichts.

In unseren Proben wurde der Quench vor allem von den Serumproteinen und von der Elutionsflüssigkeit hervorgerufen. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, war es notwendig, die Größe des Quench zu bestimmen, d.h. die Zählausbeute jeder Probe zu messen.

Die Zählausbeute (counting efficiency) ist die Anzahl der gemessenen Impulse pro Minute in Prozent der tatsächlichen Zerfälle pro Minute (Desintegrationen pro Minute). Dazu stehen drei Methoden zur Verfügung: die Internal-Standard-Methode, die External-Standard-Methode und die Channels-Ratio-Methode.

Die klassische Methode für die Bestimmung der Zählausbeute ist die Internal-Standard-Methode, wie sie von KERR et al. beschrieben wurde. Die Probe wird gezählt, um den Ausgangswert N_0 (CPM) zu erhalten. Dann wird eine bekannte Menge eines nicht quencheden radioaktiven Standards, in unserem Fall ^3H -Toluol (Fa. Packard, Frankfurt) der Probe zugesetzt. Die Probe wird noch einmal gezählt (N_1). Die Differenz zwischen den beiden Zählergebnissen $N_1 - N_0$ wird durch die bekannte Anzahl von Zerfällen des radioaktiven Standards (S) verursacht. Daraus läßt sich die Zählausbeute in % (Eff.) berechnen.

$$\text{Eff.} = \frac{N_1 - N_0}{S} \cdot 100 \%$$

Für den ersten Batch erhielten wir im Durchschnitt eine Zählausbeute von 13 %, für den zweiten Batch von 12 %. Die Internal-Standard-Methode ist aber für die Routineuntersuchungen zu aufwendig. Jede Probe muß gezählt werden, aus dem Zähler genommen werden, der Internal Standard muß zugesetzt werden, die Probe muß wieder verschlossen werden und in den Zähler zurückgestellt werden.

Die External-Standard-Methode scheint dagegen eine ideale Lösung für Routineuntersuchungen zu sein. Sie ist automatisiert, zerstört die zu messende Probe nicht und ist billig. Die Probe wird normal gezählt und das Ergebnis registriert. Dann wird eine punktförmige Strahlenquelle mit relativ hoher Gamma-Aktivität (Radium $20 \mu\text{Ci}$) - der External Standard - möglichst nahe an die zu messende Probe gebracht. Die Probe wird dann für eine kurze Zeit noch einmal gezählt. Die in der Probe durch den External Standard erzeugten Counts sind ein Maß für den Quench und werden zur Zählausbeute in Beziehung gesetzt.

Da bei den späteren Untersuchungen nicht die Desintegrationen, sondern der Quotient aus dem sogenannten freien Anteil und der Gesamtaktivität interessierte, wurde jede Probe mit dem automatischen External Standard überprüft und gegenüber einer ungequenchten Probe korrigiert.

Die Diskriminatoren des Kanals für die Quenchkorrektur wurden auf Gain 6 % und Window 1000 - ∞ eingestellt. Diese Einstellung hat sich als günstig erwiesen, da möglichst wenig Zerfälle aus dem Comptonpektrum des ^3H -Zerfalls registriert werden sollen.

Die Channels-Ratio-Methode wurde von uns nicht verwandt.

2.3 Interpretation der Elutionsprofile Einfluß der verschiedenen Gel-Arten

2.3.1 Proteinfreie Inkubationsgemische

Um den Einfluß der verschiedenen Gel-Arten während der Säulenchromatographie des Cortisols zu untersuchen, verwandten wir als Inkubationsgemisch 0,2 ml des ^3H -Cortisolstandards mit 0,2 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer (NaPP) pH 8,0, das 30 sec lang mit konstanter Pumpgeschwindigkeit

von 0,5 ml/min angesaugt wurde. Als Elutionsmittel verwendeten wir denselben Puffer wie für das Inkubationsgemisch.

Es zeigte sich, daß die Elutionsprofile weder in der Breite noch in den Maxima der Peaks übereinstimmen, wenn die Säulen mit gleichen Volumina, aber verschiedenen Sephadexgelen gefüllt wurden. Für Sephadex G-10 war etwa das doppelte Säulenvolumen als Elutionsvolumen notwendig, bis das Maximum des ^3H -Cortisol-Peaks erreicht wurde, bei Sephadex G-15 und Sephadex G-25 fine war das Elutionsvolumen kleiner als das doppelte Säulenvolumen und für Sephadex G-50 superfine reichte das einfache Säulenvolumen, um das Maximum des ^3H -Cortisol-Peaks zu erreichen.

Das bedeutet, daß beim Sephadex G-50 superfine die reversible Adsorption relativ gering ist und die Bedingungen eines idealen Molekularsiebs wenigstens annähernd erreicht werden. Versuche mit Sephadex G-75 superfine zeigten keine wesentlichen Verbesserungen im Elutionsverhalten gegenüber Sephadex G-50 superfine. Wegen der größeren Stabilität und der leichteren Handhabung entschieden wir uns für Sephadex G-50 superfine.

2.3.2 Proteinhaltige Inkubationsgemische

Bei der Untersuchung proteinhaltiger Inkubationsgemische zeigte sich beim Sephadex G-10 nach einem deutlichen ersten Peak (proteingebundener Anteil) kein zweiter scharfer Peak, sondern ein Elutionsschwanz, der seine Ursache in der reversiblen Adsorption des freien ^3H -Cortisols an die Gelmatrix hat. Erst durch Spülen mit Nachwaschserum entstand ein relativ scharfer Peak. Beim Sephadex G-25 fine fanden wir zwei Peaks, die zwar nicht durch ein Nullintervall voneinander getrennt, doch deutlich abgrenzbar waren. Der Peak des sogenannten freien ^3H -Cortisols war hier jedoch so breit, daß selbst bei

einer noch so kleinen Säule - ohne Nachwaschen mit Serum - ein so großes Batchvolumen entstand, daß die Anwendung wasserlöslicher Scintillationsgemische nicht möglich war. Erst beim Sephadex G-50 superfine wird der zweite Peak in einem praktikablen Volumen eluiert, doch waren auch hier beide Peaks nie durch einen Nullintervall voneinander getrennt, aber genügend gut und in konstanter Weise abgegrenzt. In unserem System ist der Fehler, selbst bei irrtümlicher Verschiebung der Grenze zwischen dem ersten und dem zweiten Peak um 1 min Sammelzeit, nicht größer als 4 % (Abbildung 1).

BURKE hat das fehlende Nullintervall - das bei allen Gel-Arten prinzipiell zu finden ist - damit erklärt, daß der Komplex aus Transcortin und Cortisol einer ständigen Dissoziation unterliegt, wenn er die Säule passiert (11). Dem proteingebundenen Anteil folgt direkt ^3H -Cortisol, das im untersten Teil der Säule durch Dissoziation freigesetzt wird. Später folgen langsam ansteigende Konzentrationen von ^3H -Cortisol, die an höher gelegenen Stellen der Säule abdissoziiert sind. Da der Komplex wegen seiner Größe nur das äußere Volumen V_a benutzen kann, die abdissoziierten kleineren Cortisolmoleküle aber auch in das Innere der Gelmatrix eindringen können, wird sich im äußeren Volumen eine ständige Dissoziation vollziehen, mit dem Ziel, die Bedingung des Massenwirkungsgesetzes zu erfüllen.



Da aber neben dem radioaktiven Cortisol auch das im Serum enthaltene endogene Cortisol (F) mit an der Reaktion teilnimmt, müssen wir die Gleichung entsprechend erweitern:



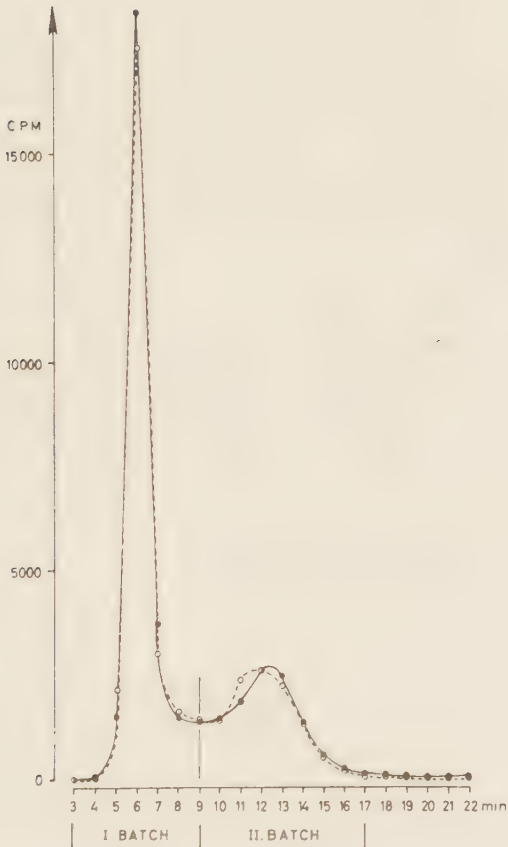


Abb.1: Trennung von proteingebundenem und freiem ^3H -Cortisol auf einer Sephadex G-50 superfine-Säule

Inkubationsgemisch: 0,2 ml Serum + 0,2 ml radioaktiver Standard

Durchflußgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

Temperatur: 26°C

Elutionsmittel: 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0.

Es sind die Werte eines Parallelversuches eingezeichnet. Darunter sind die Zeiten für die Batch-Technik angegeben.

Eine entsprechende Reaktionsgleichung ließe sich auch rein theoretisch für das Albumin (HSA) aufstellen. Es zeigte sich aber, daß die vorhandene geringe Adsorption und die bei der Diffusion in das innere Volumen freiwerdenden Kräfte ausreichen, um die Komplexbindung zwischen dem Albumin und dem Cortisol zu lösen, d.h. die Assoziationskonstante des Cortisol-HSA Komplexes ist so gering, daß die Albuminbindung nicht in die Bestimmung eingeht.

Insgesamt wird also der Quotient aus dem ungebundenen Anteil und der Gesamtaktivität eine Funktion der CBG-Konzentration und der Menge des endogenen Cortisols, der auf der Säule stattfindenden Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes, sowie der reversiblen Adsorption des freien Anteils an die Gelmatrix sein.

2.4 Faktoren, die die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes beeinflussen

2.4.1 Temperatur

Die Bindungsaffinität hängt wesentlich von der Temperatur ab. Bei 46°C findet eine vollständige Dissoziation auf der Säule statt (DOE et al.) (24). Bei tiefen Temperaturen nimmt die Dissoziation ab, ist jedoch bei Temperaturen von 4°C noch signifikant vorhanden (11). Wir führten die Versuche bei 26°C durch. Die Temperatur wurde im Temperierblock durch zirkulierendes Wasser aus einem Wasserbad aufrechterhalten.

2.4.2 Verdünnung der Probe

Bei Versuchen mit gleichen Volumina des Inkubationsgemisches, aber wechselndem Serumgehalt, erhielten wir bei sonst konstanten Versuchsbedingungen eine deutliche Abhängigkeit von der Verdünnung (Abbildung 2).

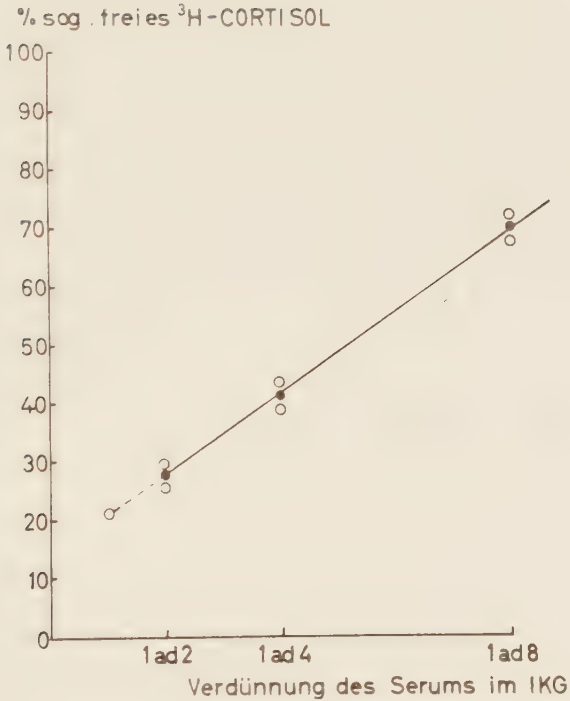


Abb.2: Abhängigkeit des sogenannten freien ^3H -Cortisols von der Serumkonzentration im Inkubationsgemisch

Das sogenannte freie ^3H -Cortisol wurde über der Verdünnung eines Normalserums im Inkubationsgemisch aufgetragen. Durch Extrapolation erhält man den Wert des sogenannten freien ^3H -Cortisols ohne vorherige Verdünnung des Serums. Angegeben sind die Doppelwerte eines Versuchs und die Mittelwerte.

2.4.3 Säulenvolumen

Direkt in Zusammenhang mit der Verdünnung der Serumprobe steht die Abhängigkeit der Dissoziation vom Säulenvolumen, da man das Säulenvolumen als weiteren Verdünnungsfaktor berücksichtigen muß. Nach Untersuchungen von WESTPHAL scheint der Quotient aus Höhe und Durchmesser keinen wesentlichen Einfluß auf die Dissoziation auszuüben. Vielmehr weist er die direkte Beziehung zwischen Säulenvolumen und Dissoziation nach (36). Für unsere Belange war eine Verkleinerung des Säulenvolumens unter 0,7 g Sephadex G-50 superfine (Trockengewicht) nicht möglich, da das Separationsvolumen V_s sonst zu klein und der Fehler, der durch die Varianz der verwandten Schläuche auf der 25 canal-micro-pump (Fa. Ismatec, Zürich, Schweiz) entsteht, zu groß geworden wäre.

2.4.4 Elutionsgeschwindigkeit

DE MOOR berichtete bereits 1962 (19), daß die schrittweise Erhöhung der Elutionsrate von 0,2 auf 2,5 ml/min zu einer Zunahme der Bindungskapazität des CBG in menschlichen Normalseren von 22,1 auf 26,1 μg Cortisol pro 100 ml Serum führte. Dies erklärt sich aus der Abhängigkeit der Adsorption des Cortisols an das Gel von der Elutionsgeschwindigkeit, d.h. bei Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit läßt sich die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes vermindern. Wir verwandten Schläuche mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min.

2.4.5 Elutionsmittel

Als Elutionsmittel untersuchten wir 0,01 M Natriumphosphatpuffer (NaPP) mit den pH-Werten 5,6,7,8. Wir fanden eine deutliche Abhängigkeit der Dissoziation vom pH-Wert,

während die Ionenstärke bei schrittweiser Änderung von 0,01 M bis 0,1 M keinen wesentlichen Einfluß zeigte. Bei pH-Werten unter 5 wurde die Bindung zwischen dem CBG und dem Cortisol fast vollständig gelöst, bei pH-Werten über 8 zeigte sich immer noch eine erstaunliche Stabilität der Bindung. Selbst mit 1 N NaOH war die Dissoziation gegenüber Werten bei pH 8 nicht wesentlich vermehrt. Um die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes während des Trennungsvorganges möglichst gering zu halten, verwendeten wir 0,01 M Natriumphosphatpuffer (NaPP) pH 8,0 (Abbildung 3).

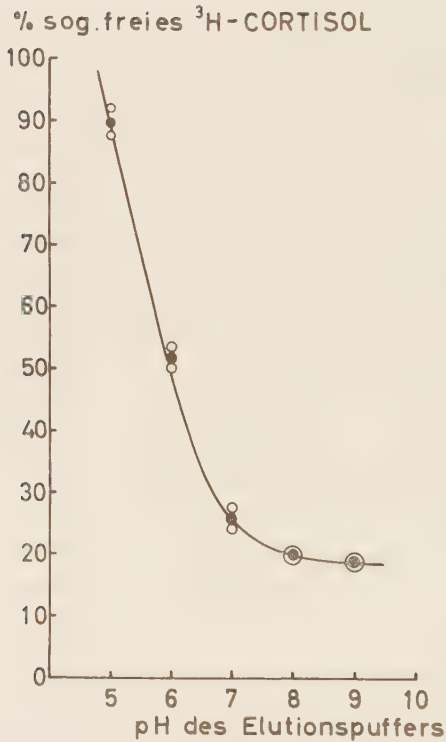


Abb.3: Einfluß des pH-Wertes des Elutionsmittels
(0,01 M Natriumphosphatpuffer) auf das so-
genannte freie ^3H -Cortisol

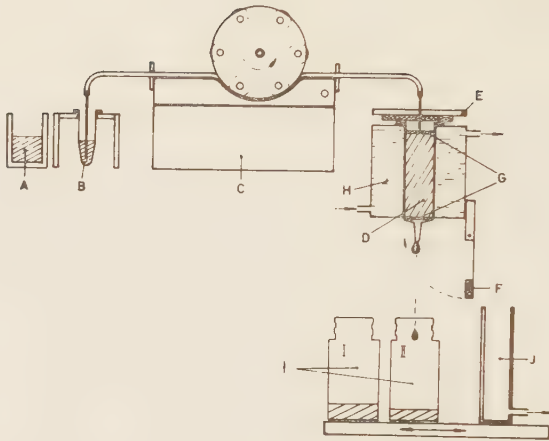
Angegeben sind die Doppelwerte eines Versuchs
und die Mittelwerte.

2.5. Automatisierung

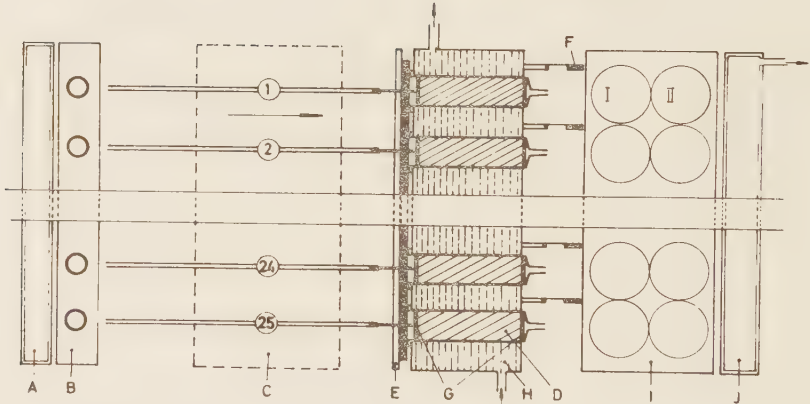
Das säulenchromatographische Trennverfahren wurde folgendermaßen automatisiert: Abbildung 4 zeigt den Längsschnitt durch die Apparatur. Aus dem Inkubationsgefäß (B) wird mit einer 25-canal-micro-pump (C) zeitgesteuert ein Aliquot des Inkubationsgemisches auf die Dextrangelsäule (D) aufgetragen. Diese Säulen sind von einem Thermoblock (H) umschlossen. Nach dem Auftragen wird aus dem Vorratsgefäß (A) mit Natriumphosphatpuffer eluiert. Die proteingebundene Fraktion wird zeitgesteuert in dem Röhrchen I aufgefangen, der freie Anteil im Röhrchen II.

Dieses halbautomatische Analysengerät wurde zunächst für den T_3 -in vitro Test entwickelt (37,38). Nach kleinen technischen Veränderungen konnte das gleiche Gerät auch für die Bestimmung des "sogenannten freien 3H -Cortisols" verwandt werden.

a



b



- A Puffervorratsgefäß
- B Inkubationsgefäß
- C 25-canal-micro-pump
- D Dextrangelsäule
- E obere Deckplatte
- F Verschuß für die Ausflußöffnung
- G Membranfilter
- H Thermoblock
- I Sammelröhrchen (I,II)
- J Gefäß für den Vorlauf

Abb.4: Schematische Darstellung der Apparatur zur simultanen Säulenchromatographie (37)

- a) Längsschnitt
- b) Aufblick

Erklärung s. Text.

2.6 Ergebnisse

2.6.1 9⁰⁰ Uhr Nüchternwerte

2.6.1.1 Normalpersonen

Untersucht wurden 21 stoffwechselgesunde Angehörige des Personals der Klinik und 22 Patienten, die nicht endokrin erkrankt waren. Bei einer Gauß'schen Normalverteilung fanden wir für das sogenannte freie ^3H -Cortisol einen Mittelwert von $24,3 \pm 3,1 \%$ ($\bar{x} \pm s$) $N = 43$; der Normalbereich erstreckte sich von $18,2 - 30,5 \%$ ($\bar{x} \pm 2s$). Die Blutentnahme erfolgte um 9 Uhr, um die Abhängigkeit des endogenen Cortisols von der Tagesrhythmik auszuschalten. Bisher wurde allerdings keine tageszeitliche Abhängigkeit der Cortisolbindungskapazität beschrieben.

2.6.1.2 Patienten mit primärer oder sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz

2.6.1.2.1 Primäre Nebennierenrindeninsuffizienzen

Das Blut wurde 24 Std. nach Absetzen der Hydrocortisonsubstitution unter Substitution mit $2 \times 0,25$ mg Dexamethason/tgl. um 9 Uhr entnommen. Bei 13 Patienten mit Morbus Addison oder beidseitiger totaler Adrenalektomie fanden wir ein sogenanntes freies ^3H -Cortisol von: $15,8 \pm 1,4 \%$ ($\bar{x} \pm s$).

2.6.1.2.2 Patienten mit sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz

11 Patienten mit vollständiger sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz wurden untersucht. Für das sogenannte freie ^3H -Cortisol ergab sich ein Mittelwert von $16,2 \pm 1,5 \%$ ($\bar{x} \pm s$).

Insgesamt sind die Werte für die Patienten mit primärer oder sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz deutlich vom Normalkollektiv getrennt.

2.6.1.3 Gravide Patientinnen bzw. Antioovulantien und Östrogentherapie

Die gegenüber dem Normalbereich stark erniedrigten Werte des sogenannten freien ^3H -Cortisols sind nicht wie bei den Nebennierenrindeninsuffizienzen auf einen verminderten Spiegel des endogenen Cortisols zurückzuführen, sondern resultieren aus der Vermehrung des CBG. Bei 10 Patientinnen war der Mittelwert des sogenannten freien ^3H -Cortisols mit $15,2 \pm 2,0 \%$ ($\bar{x} \pm s$) fast identisch mit dem der Patienten mit primärer Nebennierenrindeninsuffizienz.

2.6.1.4 Patienten mit Cushing-Syndrom

Bei 3 Patienten mit gesichertem Cushing-Syndrom fanden wir für das sogenannte freie ^3H -Cortisol erhöhte Werte von 34,0 %, 48,6 % und 49,0 % (Abbildung 5).

2.6.2 Stimulationsteste und Suppressionsteste

2.6.2.1 Intravenöser ACTH-Belastungstest

2.6.2.1.1 Normalpersonen

Der ACTH-Belastungstest wird angewandt, um zu entscheiden, ob die Nebennierenrinden eines Patienten in regelrechter Weise auf ACTH vermehrt Cortisol ausschütten. Nach Entnahme eines 9 Uhr Nüchternwertes (Wert A) wird eine Infusion (500 ml 0,9 %ige NaCl oder 5 %ige Laevuloselösung), die 0,25 mg Synacthen enthält, angelegt. Bei einer Tropfzahl von ca. 40 pro Minute läuft die Infusion etwa 4 Stun-

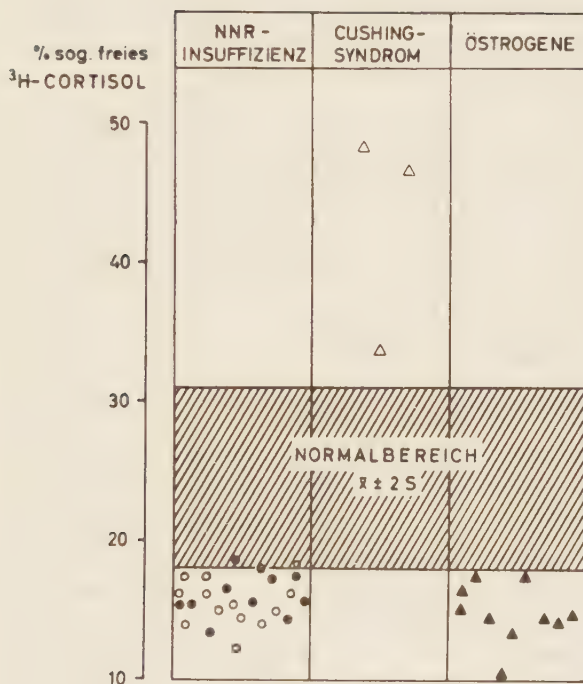


Abb.5: Das sogenannte freie ³H-Cortisol bei verschiedenen Funktionszuständen der Nebennierenrinde und bei Therapie mit Östrogenen

primäre NNR-Insuffizienzen (○), sekundäre NNR-Insuffizienzen (●).

den. Direkt im Anschluß wird der 13 Uhr Wert (Wert B) abgenommen. Bei 17 Patienten ohne endokrine Erkrankung betrug der A-Wert (9 Uhr) im Mittel $25,9 \pm 2,6 \%$ ($\bar{x} \pm s$), der B-Wert (13 Uhr) $71,4 \pm 7,0 \%$ ($\bar{x} \pm s$). Die A-Werte stimmen gut mit den 9 Uhr Nüchternwerten der Normalpersonen überein, für den B-Wert errechnet sich ein Normalbereich: $57,4 - 85,4 \%$ ($\bar{x} \pm 2 s$).

2.6.2.1.2 ACTH-Belastungstest bei Patienten mit primärer NNR-Insuffizienz und bei Patienten mit Hypophysentumoren

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der intravenösen ACTH-Belastung bei Patienten mit einer primären NNR-Insuffizienz, bzw. bei Patienten mit einem Hypophysentumor. Es lassen sich die NNR-Funktion bzw. der Grad der Unterfunktion mit dem sogenannten freien ^3H -Cortisol gut erfassen.

2.6.2.2 Dexamethason-Suppressionstest

2.6.2.2.1 Normalpersonen

Diese Funktionsuntersuchung dient zum Nachweis bzw. Ausschluß eines Hypercortizismus und gibt damit Auskunft über die Funktion des Regelkreises Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinde.

Als Vergleichswert wird am Morgen (9 Uhr) ein Nüchternwert abgenommen. Am Abend des gleichen Tages (ca. 22 Uhr) werden 2 mg Dexamethason und 10 mg Valium oral verabreicht. Am Morgen des nächsten Tages um 9 Uhr wird wieder zur Cortisolbestimmung Blut entnommen (Wert nach Dexamethason).

Bei 10 gesunden Testpersonen betrugen die Ausgangswerte im Mittel $24,2 \pm 2,4 \%$ ($\bar{x} \pm s$), die Werte nach Dexamethason $16,7 \pm 1,0 \%$ ($\bar{x} \pm s$), der Normalbereich errechnet sich zu: $14,7 - 18,7 \%$ ($\bar{x} \pm 2 s$). Der Mittelwert liegt zwar deutlich außerhalb des Normalbereichs der Ausgangswerte, die Grenzen der Normalbereiche berühren sich jedoch.

2.6.2.2.2 Patienten mit Verdacht auf ein Cushing-Syndrom

Neben den eindeutig supprimierbaren und den Cushing-Fällen mit aufgehobener bzw. eingeschränkter Suppression

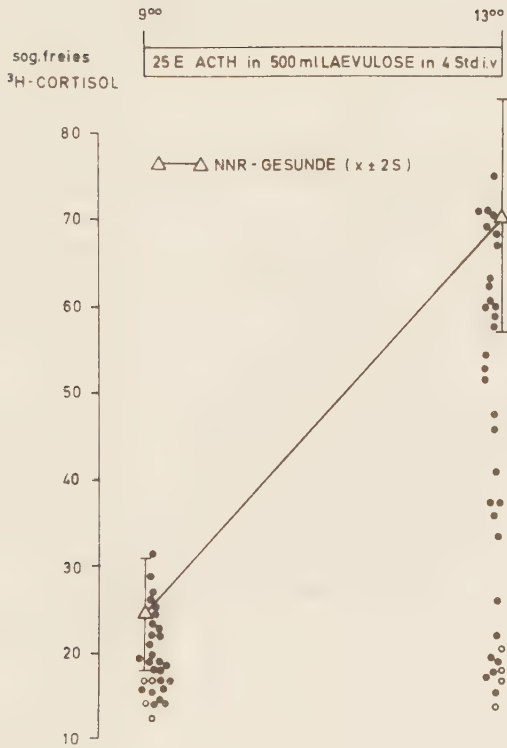


Abb.6: Veränderung des sogenannten freien ^3H -Cortisols beim intravenösen ACTH-Belastungstest

Eingezeichnet sind der Normalbereich sowie die Werte von Patienten mit Hypophysentumoren (●) und von Patienten mit primärer NNR-Insuffizienz (○).

finden sich vereinzelt Patienten, die nicht ganz ausreichend supprimierbar sind. Es handelt sich dabei um ambulante Patienten bzw. um adipöse Patienten, z.T. auch unter Nulldiät, bei denen ein Cushing-Syndrom durch weitere Funktionsteste ausgeschlossen werden konnte.

%sog. freies
 ^3H -CORTISOL

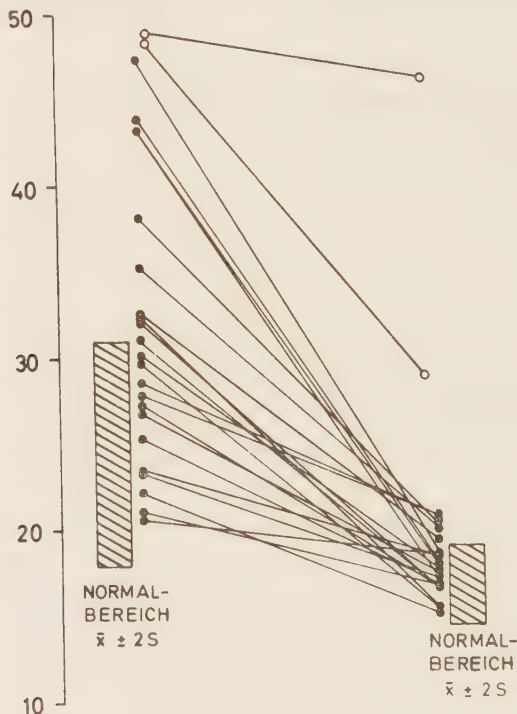


Abb.7: Verhalten des sogenannten freien ^3H -Cortisols beim Dexamethason Suppressionstest

Eingezeichnet sind der Normalbereich sowie die Werte von zwei Patienten mit nachgewiesenem Cushing-Syndrom (○) und von Patienten mit Verdacht auf ein Cushing-Syndrom (●) (s. 2.6.2.2.2)

Der Dexamethason-Hemmtest schließt also bei ausreichender Suppression einen Hypercortizismus aus, während bei nicht ausreichender Suppression ein Cushing-Syndrom noch nicht bewiesen ist (Abbildung 7).

3 COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-ANALYSE (CPBA) FÜR PLASMACORTISOL

3.1 Prinzip

MURPHY definierte die CPBA als die Form der Sättigungsanalyse, bei der das eine reagierende Molekül ein Protein mit hoher Spezifität und Affinität gegenüber einem zweiten Molekül, nämlich dem Liganden ist (61). EKINS hatte bereits 1961 den Begriff Sättigungsanalyse für eine Methode vorgeschlagen, bei der eine zu untersuchende Substanz mit einem spezifischen Reagens in solcher Konzentration gemischt wird, daß ein Teil reagiert (gebunden wird), der Rest nicht reagiert (ungebunden bleibt) (2). Unter konstanten Versuchsbedingungen ist der Quotient aus dem gebundenen und dem freien Anteil, der durch die Verteilung des radioaktiven Standards ermittelt wird, von der Konzentration der zu untersuchenden Substanz abhängig. Durch den Vergleich mit Standarddeichkurven können unbekannte Konzentrationen bestimmt werden (Abbildung 8).

Eine solche Methode kann in folgende Schritte unterteilt werden:

- Freisetzung der zu messenden Substanz aus dem biologischen Material bzw. Vorreinigung
- Reaktion mit dem spezifischen Reagens
- Trennung von gebundenem und freiem Anteil.

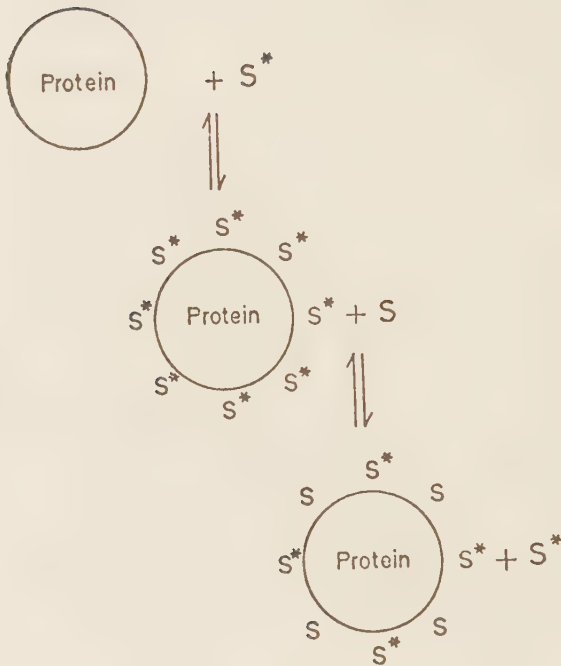


Abb.8: Schema des Prinzips der Competitiven Proteinbindungs-Analyse (CPBA) (9)

S^* = radioaktiv markiertes Steroid,
 S = nichtmarkiertes Steroid

3.2 Methodik

3.2.1 Extraktion des Cortisols aus dem Serum

Für die Messung der Gesamtspiegel im menschlichen Serum ist die Freisetzung des Cortisols aus seinen Proteinbindungen notwendig, da das hauptsächlich Cortisol bindende

Protein - das CBG - ja später als spezifisches Reagens zur Sättigungsanalyse (s. 3.1) verwendet werden soll. Für die Lösung der Proteinbindung stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die Fällung der Proteine und die Extraktion. Wir haben sowohl die Fällung mit Äthanol als auch die Extraktion mit Dichlormethan versucht. Der Nachteil der äthanolischen Präzipitation war die nicht ganz vollständige Zerstörung der CBG-Cortisol Bindung.

Bei den weiteren Versuchen haben wir mit Dichlormethan extrahiert. 0,5 ml Serum wurden in graduierte Gläser mit Schliffstopfen pipettiert. Aus einer Bürette wurden 2,5 ml Dichlormethan in jedes Glas abgefüllt. Die Extraktion erfolgte durch Rotieren (1 min lang) auf einem Whirle Mix (Fa. Bender und Hobein, München). Danach wurden die Proben mit der Wasserstrahlpumpe durch eine feine Nadel auf 2 ml abgesaugt. Die Wiederfinderaten nach der Extraktion (und Absaugen) lagen im Durchschnitt bei ca. 90 %. Unter einem Luftstrom wurden die Proben in einem Wasserbad bei 40°C eingedampft.

3.2.2 Kalte Hormonstandards

Aus einem Stockstandard von Cortisol (300 µg/ml) wurden Standards mit den Konzentrationen 1,3,5,10,15,30,60,100 µg/100 ml verdünnt. Bei der Anfertigung der Eichkurve wurde genauso verfahren, wie es oben für die Serumwerte beschrieben wurde.

3.2.3 Spezifisches Reagens

3.2.3.1 Gewinnung des CBG-Serums

Entsprechend einem Vorschlag von JOHANNSON (39) wurde einer Patientin, die aus medizinischer Indikation länger als 14 Tage mit 100 µg Äthinylöstradiol pro die behandelt

wurde, Blut abgenommen. Zusätzlich wurden am Vorabend der Blutentnahme 2 mg Dexamethason zur Suppression der endogenen Cortisolsekretion verabreicht. Das gewonnene Serum wurde in Aliquots zu 1 ml abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.2 Wiederaufnahme der eingedampften Proben

Den eingedampften Proben wurden 0,6 ml des verdünnten CBG-Serums zugesetzt, kurze Zeit auf dem Whirle Mix geschüttelt und für fünf Minuten in ein Wasserbad von 26°C gestellt.

3.2.4 Trennung der proteingebundenen und der freien Fraktion

0,3 ml des verdünnten CBG-Serums, mit dem die eingedampften Proben aufgenommen wurden, wurden mit 0,1 ml radioaktiven Standards inkubiert und der Chromatographie über Sephadex G-50 superfine-Säulen unterworfen (Automatisierung s. 2.5).

Ausgehend von der Theorie der Kompetitiven Proteinbindungs-Analyse wäre eine möglichst hohe Verdünnung des CBG-Serums wünschenswert, um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen (59,60). Wie wir bereits berichtet haben (s.2.4.2), nimmt die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes auf der Dextrangelsäule mit der Verdünnung zu. Der Anteil des freien ^3H -Cortisols wird schon bei den Leerwerten beträchtlich und limitiert so die Verdünnung des CBG-Serums.

3.2.5 Eichkurve

Um eine genügend empfindliche Eichkurve zu erhalten, wurde das CBG-Serum bei verschiedenen Verdünnungen ausgetestet.



Abb.9: Standard Eichkurve für Cortisol

Der freie Anteil (F) wurde in Prozent der Gesamtaktivität gegen den Cortisolgehalt des Ansatzes aufgetragen. CBG-Serum: W.M. nach Dexamethason, verdünnt 1 ad 12. Trennung von proteingebundenem und freiem Anteil über eine Sephadex G-50 superfine-Säule.

Die Abbildung 9 zeigt den für die Sättigungsanalysen typischen sigmoidalen Verlauf der Eichkurve. Der zunächst

schwache Anstieg zeigt, daß in diesem Fall noch nicht alle Bindungsstellen (binding sites) an den CBG-Molekülen besetzt sind. Es wird also Cortisol gebunden, ohne zu einer Verdrängung von radioaktivem Hormon zu führen. Erst nach einer vollständigen Absättigung mit dem radioaktiven Tracer kommt es auf Grund des Massenwirkungsgesetzes zu einer Konkurrenz zwischen dem gebundenen radioaktiven Cortisol und dem freien nicht radioaktiven Cortisol.

Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit dieser Eichkurve wäre also durch eine weitere Verdünnung des CBG-Serums und vorherige Absättigung mit dem Tracer zu erreichen. Das ist aber für die routinemäßige Serumcortisolbestimmung nicht erforderlich.

3.2.6 Spezifität der CPBA

Im Dichlormethanextrakt sind neben Cortisol auch andere Steroide, wie z.B. Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Cortison, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, 17α -Hydroxyprogesteron vorhanden, die in der Lage sind, ^3H -Cortisol aus der Transcortinbindung zu verdrängen und so das Ergebnis zu beeinflussen (67).

Verschiedenartige Proteine, wie Serumproteine, Gewebsproteine und Antikörper wurden verwandt, um eine CPBA bzw. ein Radioimmunoassay aufzubauen, aber bis jetzt konnte kein Protein gefunden werden, das ausschließlich ein einzelnes Steroid binden kann. Vielmehr wird eine mehr oder minder große Anzahl von chemisch verwandten Stoffen gebunden. Bei bestimmten Fragestellungen wird man deshalb, um die Spezifität der Methode zu erhöhen, die kompetitiven Analoge abtrennen müssen, wie z.B. beim adrenogenitalen Syndrom, bei Neugeborenen und eventuell in der späten Schwangerschaft.

Die bisher verwandten Methoden zur Trennung von Steroiden waren die Dünnschichtchromatographie und die Papierchromatographie.

matographie. Zahlreiche Nachteile, wie die schwierige Durchführung, der hohe und unterschiedliche Leerwert und der große Zeitaufwand haben die Verwendung in der klinischen Diagnostik nur beschränkt möglich gemacht (62).

Wenn keine chromatographische Trennung durchgeführt wird, ist die Spezifität der Methode natürlich deutlich geringer, d.h. sie korreliert mehr oder weniger mit der Spezifität des Transcortins und der Affinität des betreffenden Steroids zur Gelmatrix.

Wir haben deshalb zur genaueren Erfassung der Mitreaktion kalte Standards der Hormone Corticosteron, 17α -Hydroxyprogesteron, 11-Desoxycortisol, Progesteron, Cortison, Dehydroepiandrosteron, Testosteron und Östradiol mit aufsteigender Konzentration als Substrat im Assay verwandt (Abbildung 10).

Es zeigt sich, daß vor allem Corticosteron, Progesteron, 17α -Hydroxyprogesteron und 11-Desoxycortisol durch Kompetition mit in das Ergebnis eingehen. Im Vergleich zu den Plasmacortisolspiegeln ist die Konzentration dieser Hormone allerdings normalerweise extrem niedrig, sodaß unter gewöhnlichen Bedingungen die klinische Nützlichkeit nicht oder nur gering beeinflußt wird.

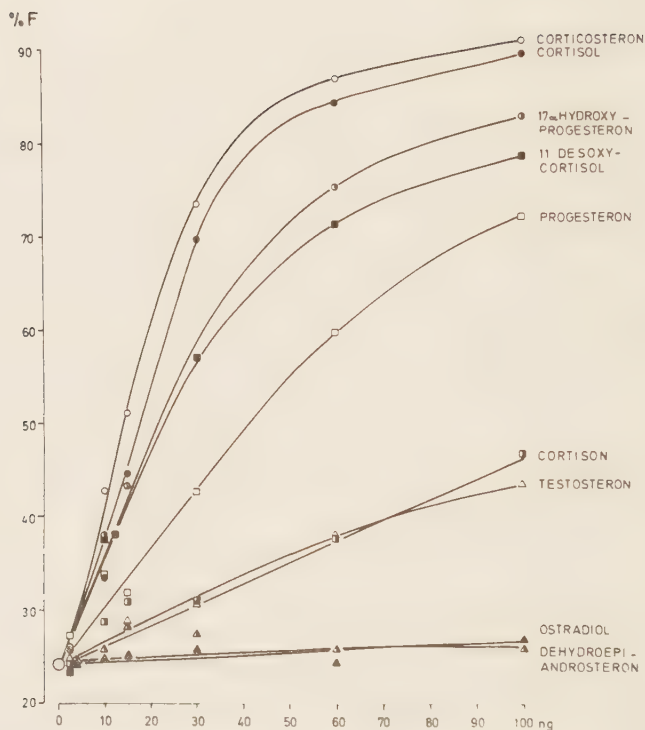


Abb. 10: Standardeichkurven für verschiedene Steroide

Der freie Anteil (F) wurde in Prozent der Gesamtaktivität gegen den Hormongehalt des Ansatzes aufgetragen. Die experimentellen Bedingungen sind die gleichen wie bei Abb. 9.

3.3 Trennung von Steroiden über eine Sephadex LH-20-Säule

Wie oben angegeben (s. 3.2.6), ist für manche Fragestellungen eine spezifischere Bestimmung einzelner Steroide wünschenswert. Dafür ist eine Trennung der Steroide vor

der Bestimmung notwendig. Die Verwendung einer Sephadex LH-20-Säule geht auf die Anregung von SJÖVALL et al. zurück (52,80). Sephadex LH-20 ist ein hydroxylpropyliertes Dextran, das in organischen Lösungsmitteln gequellt werden kann. Die chromatographische Trennung wird erreicht durch den Molekülsiebeffekt, die reversible Adsorption und die Verteilung zwischen den Lösungsmitteln. Als Elutionsmittel verwandten wir nach Vorversuchen Dichlormethan 98 % und Methanol 2 %. Durch die polaren Gruppen kommt es im Inneren der Gelmatrix zu einer mit Dichlormethan angereicherten Methanolatmosphäre, während im äußeren Volumen methanolisches Dichlormethan läuft. Entsprechend erscheinen im Eluat zuerst die weniger polaren Steroide, gefolgt von Steroiden mit einer größeren Anzahl von polaren Gruppen.

Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

0,1 ml der wässrigen Standards der Hormone: Cortisol-1, 2-³H, S.A. 46 Ci/mMol, Progesteron-1, 2-³H, S.A. 41 Ci/mMol, Corticosteron-1, 2-³H, S.A. 30 Ci/mMol, 11-Desoxy-³H-Cortisol S.A. 35 Ci/mMol wurden mit 2 ml Dichlormethan extrahiert, das Rohextrakt wurde auf 1,5 ml abgesaugt, im Luftstrom bei 40°C eingedampft und im Elutionsmittel wieder aufgelöst. Nach dem Auftragen auf die Säule wurde das Vorratsgefäß angeschlossen und mit dem Sammeln begonnen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt, eingedampft und mit 15 ml Scintillationsgemisch (Zusammensetzung: 5 l Toluol, 15 g PPO, 3 g Dimethyl-POPOP) gezählt. Für jedes der genannten Hormone wurde ein Elutionsdiagramm ermittelt. An Hand dieser Elutionsprofile konnten die einzelnen Hormone in einem Hormongemisch nach der Chromatographie identifiziert werden (Abbildung 11).

Aus einem Gemisch der Steroide konnte immer eine Abtrennung des Cortisols erreicht werden, eine weitere Auftrennung von Progesteron, 17 α -Hydroxyprogesteron, Corti-

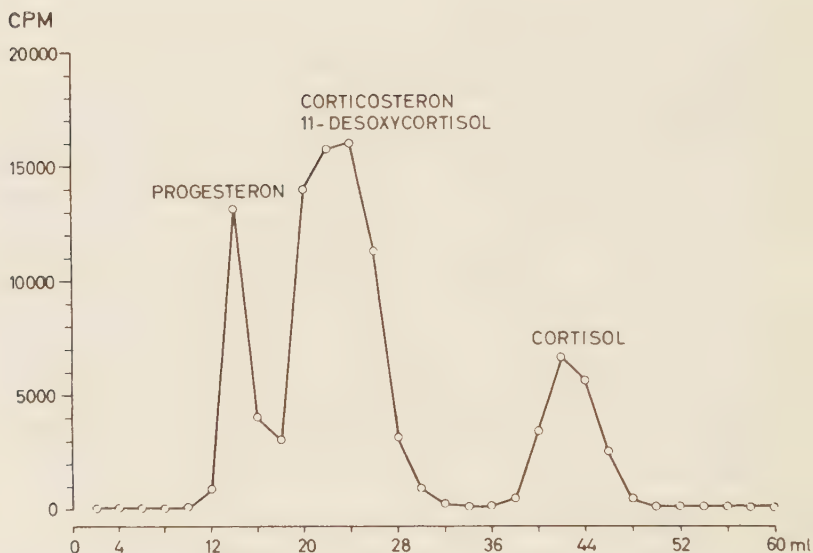


Abb.11: Chromatographische Auftrennung der Hormone Progesteron, Corticosteron, 11-Desoxycortisol und Cortisol über eine Sephadex LH-20-Säule

costeron, 11-Desoxycortisol, war jedoch erst bei einer Säulenhöhe von 40 cm und einem Durchmesser von 0,8 cm möglich. Die einzelnen Steroide waren hierbei jedoch nicht durch ein Nullintervall voneinander getrennt.

Besondere Schwierigkeiten bereitete die Handhabung des Lösungsmittels Dichlormethan. Die Versuche sind nur bei strenger Temperaturkonstanz reproduzierbar, da die Durchflußgeschwindigkeit wesentlich von der Temperatur abhängt.

Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag und des Zeitaufwandes, der notwendig ist, um eine Chromatographie auf solch großen Säulen durchzuführen, erscheint eine weitere methodische Verbesserung mit dem Ziel routinemäßiger Messungen einzelner Steroidhormone schwer möglich zu sein.

4 COMPETITIVE PROTEINBINDUNGS-ANALYSE (CPBA) FÜR PLASMACORTISOL OHNE EXTRAKTION MIT ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN

4.1 Vorversuche

Bei den beschriebenen Untersuchungen (s. 2.3.2) mit Sephadex G-10 erhielten wir für proteinhaltige Inkubationsgemische folgendes Elutionsprofil (Abb.12): Dabei kommt der zweite Peak des Elutionsprofils dadurch zu Stande, daß durch ein Nachwaschserum die reversible Adsorption des ^3H -Cortisols zum Sephadex G-10 schneller aufgehoben wird. Es wird also die Elutionsdauer deutlich abgekürzt. Es wurde nun an die Möglichkeit gedacht, das als freies Cortisol an die Gelmatrix reversibel adsorbierte Hormon mit einer modifizierten CPBA zu messen. Bei Kenntnis der Größe des ersten Peaks und damit der Proteinbindung des Cortisols im zu untersuchenden Serum, sollte dadurch gleichzeitig - unter Berücksichtigung dieser Proteinbindung zur rechnerischen Korrektur - die Bestimmung des Hormongesamtspiegels ermöglicht werden.

Die Versuchsanordnung sah folgendermaßen aus:

Das zu untersuchende Serum (0,2 ml) wird mit radioaktivem Standard (0,2 ml) als Tracer inkubiert (s. 2.2.2) und auf eine Säule (4 g Sephadex G-10, Säulenvolumen 10 ml) gepumpt. Das an spezifische Proteine gebundene Cortisol wird mit dem äußeren Volumen eluiert, das "sogenannte freie ^3H -Cortisol" (s. 2.1) auf der Säule retiniert. Anschließend wird eine konstante Menge verdünnten CBG-Serums (s. 3.2.5) auf die Säule aufgetragen. Das danach immer noch auf der Säule verbliebene Cortisol wird mit einem Nachwaschserum eluiert.

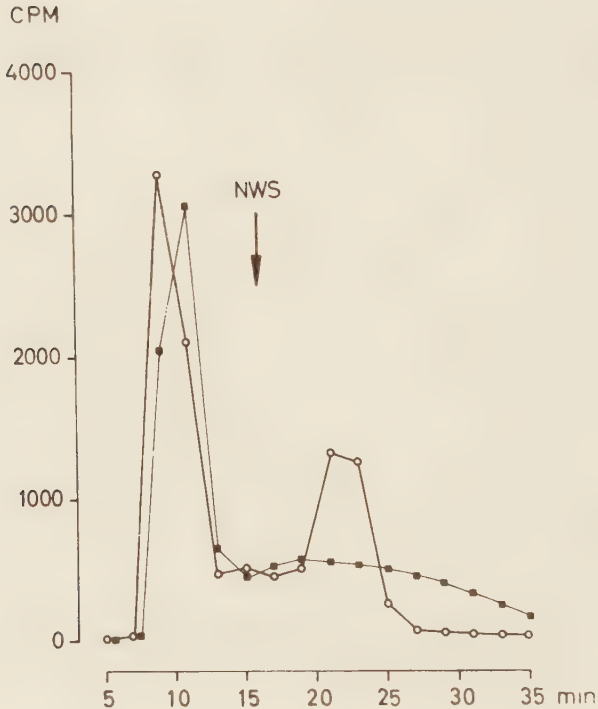


Abb.12: Trennung von proteingebundenem und freiem ^3H -Cortisol auf einer Sephadex G-10-Säule

Säule: 2 g Sephadex G-10

Inkubationsgemisch: 0,2 ml Serum + 0,2 ml radioaktiver Standard

Durchflußgeschwindigkeit: 0,5 ml/min

Elutionsmittel: 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0.

Eingezeichnet ist das Elutionsverhalten mit (○—○) und ohne (■—■) Nachwaschen mit Serum. NWS kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem das Nachwaschserum auf die Säule aufgetragen wurde.

Für die Eichkurve wurden kalte Cortisolstandards (0,2 ml) aufsteigender Konzentration mit radioaktivem Standard (0,2 ml) inkubiert und auf die Säule gepumpt. Dann wurde

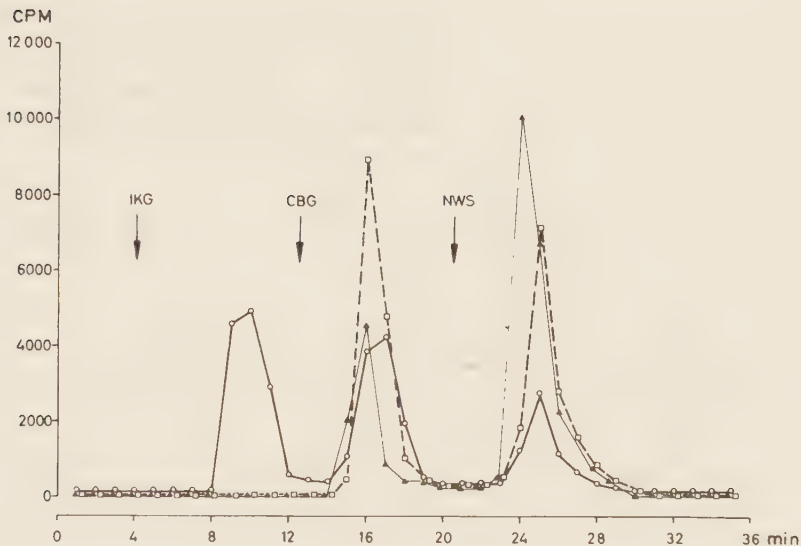


Abb.13: Zum Versuch, gleichzeitig das sogenannte freie ^3H -Cortisol und den Absolutwert zu bestimmen.
Elutionsprofile dreier Inkubationsgemische

Inkubationsgemische:

o,2 ml Serum + o,2 ml radioaktiver Standard (○—○)

o,2 ml kalter Cortisolstandard (3 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

+ o,2 ml radioaktiver Standard (□—□)

o,2 ml kalter Cortisolstandard (30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

+ o,2 ml radioaktiver Standard (▲—▲).

IKG, CBG, NWS kennzeichnen die Zeitpunkte, an denen das Inkubationsgemisch, das CBG-Serum und das Nachwaschserum auf die Säule aufgetragen wurden.

Weitere Erläuterungen s. Text.

verfahren wie mit den Serumwerten. Der einzige Unterschied war, daß bei den Eichwerten ein erster Peak fehlte, da kein Protein im Inkubationsansatz enthalten war (Abb.13).

Als Eichkurve wurde der Quotient aus dem freien ^3H -Cortisol-Anteil in Prozent der Gesamtaktivität gegen die Absolutwerte der kalten Standards aufgetragen.

Bei Serumwerten wurde zur Bestimmung der auf der Dextran-
gelsäule retinierten Hormonmenge der ^3H -Cortisol-Anteil
des dritten Peaks in Prozent der Summe aus dem zweiten
und dem dritten Peak errechnet und der dazu gehörige Wert
an der Eichkurve abgelesen (s. Formel a).

$$\text{a) } \frac{\text{CPM (3.Peak)}}{\text{CPM (2.Peak + 3.Peak)}} \cdot 100 \% = \text{Prozent F}$$

% F abgelesen an der Eichkurve ergibt Cortisol in
 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Der erhaltene Wert war aber nur ein Bruchteil
der Gesamthormonmenge, da der an Plasmaproteine gebundene
Anteil im ersten Peak von der Säule eluiert wurde. Da
aber dieser Cortisolanteil in seiner Höhe durch Messung
der ^3H -Cortisol-Aktivität im ersten Peak ebenfalls bekannt
war, konnte daraus die Gesamthormonmenge errechnet werden
(s. Formel b).

$$\text{b) } \text{Cortisol } \frac{\text{CPM (Peak 1 + 2 + 3)}}{\text{CPM (Peak 2 + 3)}} = \text{Gesamtcortisol}$$

$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Bei der praktischen Durchführung zeigte sich leider, daß
zahlreiche Serum-Cortisol-Werte nicht auf der Eichkurve
abgelesen werden konnten, da für sie % F (s. Formel a) un-
ter dem Leerwert der Eichkurve lag. Entsprechend ergaben
Seren, die von Patienten nach einer Infusion von ACTH ge-
wonnen waren, falsche niedrige Werte.

Wir fanden, daß vor allem zwei Bedingungen bei der Bestim-
mung der Serumwerte nicht identisch mit den Versuchsbedin-
gungen bei der Bestimmung der Eichwerte waren:

a) unterschiedliche Radioaktivitätsmengen

Bei den Serumwerten ist die auf der Säule verbliebene Ak-
tivität eine Funktion der auf der Säule verbliebenen Menge

an kaltem Hormon, da bereits eine Verteilung zwischen proteingebundenem und freiem Hormon stattgefunden hat. Bei den Eichwerten dagegen ist die vorhandene Radioaktivität unabhängig von der Menge an kaltem Hormon konstant.

b) unterschiedliche Lokalisation auf der Säule

Die Verteilung des freien Cortisols erfolgt bei den Serumwerten gleichmäßig über die ganze Säule, da sie abgesehen von dem im Serum physiologisch freien Hormon aus der Dissoziation während der Chromatographie resultiert. Im Gegensatz dazu werden, wie die Elutionsprofile von Cortisolstandards auf Sephadex G-10 (s. 2.3.1) zeigen, die kalten Standards als relativ scharfe Banden oben auf der Säule retiniert. Diese verschiedenen Lokalisationen auf der Säule führen zu einer unterschiedlich langen Reaktionsdauer des am Gel adsorbierten Cortisols mit dem CBG-Serum und sind damit eine weitere Ursache für die Nichtvereinbarkeit von Standard- und Serumwerten.

4.2 Prinzip

Aus den eben beschriebenen Gründen läßt sich nicht gleichzeitig auf einer Säule eine Aussage über die Proteinbindungsverhältnisse und über die absolute Cortisol-Hormonmenge machen.

Wir versuchten deshalb, durch irreversible Zerstörung der Proteinbindung sowohl die Bedingungen der konstanten Gesamtaktivität als auch der gleichen Lokalisation direkt auf der Säule zu erreichen. Damit sollte eine vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln vermieden werden, die eine Automatisierung der Methode (s. 2.5) erheblich erschweren würde. Aus den Vorversuchen (s. 2.4.5) war bekannt, daß bei einem pH-Wert um 5 eine fast vollständige Zerstörung der Bindung an Serumproteine (vor allem dem CBG) zu erreichen ist.

Als Kriterium für die vollständige Zerstörung der Bindungen wurde die Übereinstimmung der Elutionsprofile eines proteinhaltigen Inkubationsgemisches und eines proteinfreien Inkubationsgemisches gefordert.

Dies war der Fall bei Ansäuern des Inkubationsgemisches mit N/10 HCl und Filtration über eine sauer äquilibrierte Säule. Anschließend wird mit einem Puffer nachgewaschen. Hierdurch werden einerseits die denaturierten Eiweiße eluiert, während die Hormone an die Gelmatrix reversibel adsorbiert, d.h. zeitlich deutlich verzögert eluiert werden. Andererseits wird gleichzeitig durch den Puffer der pH-Wert der Säule in den Normalbereich gebracht. Jetzt kann die Reaktion des adsorbierten Cortisols mit dem spezifischen Reagens (CBG-Serum) stattfinden. Das CBG-Serum muß allerdings so rechtzeitig nach der Umpufferung auf die Säule gepumpt werden, daß die Elution des Cortisols durch den Puffer noch nicht begonnen hat. Schließlich beginnt damit bereits die Trennung von proteingebundenem (CBG-Serum gebundenem) und freiem (an die Säule adsorbiertem) Anteil, der durch Nachwaschserum eluiert wird.

4.3 Methodik

Einige methodische Einzelheiten, wie z.B. CBG-Serum, Nachwaschserum, Bereitung der Säulen, wurden bereits in Kapitel 2.2 erwähnt.

4.3.1 Durchführung

Auf die mit N/10 HCl äquilibrierten, temperaturkonstanten (26°C) Säulen (2 g Sephadex G-10, Säulenvolumen 5 ml) werden 0,3 ml Inkubationsgemisch (0,1 ml Serum bzw. 0,1 ml kalter Cortisolstandard + 0,1 ml radioaktiver Standard + 0,1 ml N/10 HCl) gepumpt. Danach wird die Säule mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 umgepuffert.

Vom Ende der 9. min nach Versuchsbeginn werden 0,5 ml eines verdünnten CBG-Serums angesaugt. Nach Verwerfen des Eluats (denaturierte Proteine und Säure) bis zum Ende der 15. min, wird der erste Batch (CBG-Serum gebundener Anteil) bis zum Ende der 28. min gesammelt. Der auf der Säule verbliebene (freie) Anteil wird mit 1,5 ml Nachwaschserum (über die Säule von der 26. bis zur 32. min gepumpt) eluiert und bis zum Ende der 48. min gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 0,25 ml/min (Proportionierschläuche der Fa. Technikon, Frankfurt/M).

4.3.2 Eichkurve

Die bisherige Auswertung der Competitiven Proteinbindungsanalyse erfolgte mit Hilfe einer handgezeichneten Eichkurve. Dabei ließen sich Fehler nicht vermeiden, die durch eine zumindest streckenweise ziemlich willkürliche Linienführung der Eichkurve entstanden. Die Einführung der Logit-Transformation (29,72) bedeutete deshalb einen wesentlichen Fortschritt, da die Eichkurve über weite Strecken linear und damit weit weniger anfällig für Zeichenfehler wurde, wenn auch die Ablesegenauigkeit an den Enden der Eichkurve zunimmt (Abbildung 14a).

Seit einiger Zeit sind wir in der Lage, durch Einsatz des elektronischen Rechners SIEMENS 404/3 und eines Graphomaten, die Eichkurve und die Standardabweichungen in einem halblogarithmischen Koordinatensystem aufzuzeichnen. Durch ein gesondertes Glättungsprogramm können falsche Meßwerte eliminiert werden. In einem weiteren Teil des Programms können unbekannte Hormonkonzentrationen an der Eichkurve abgelesen werden (46) (Abbildung 14b).

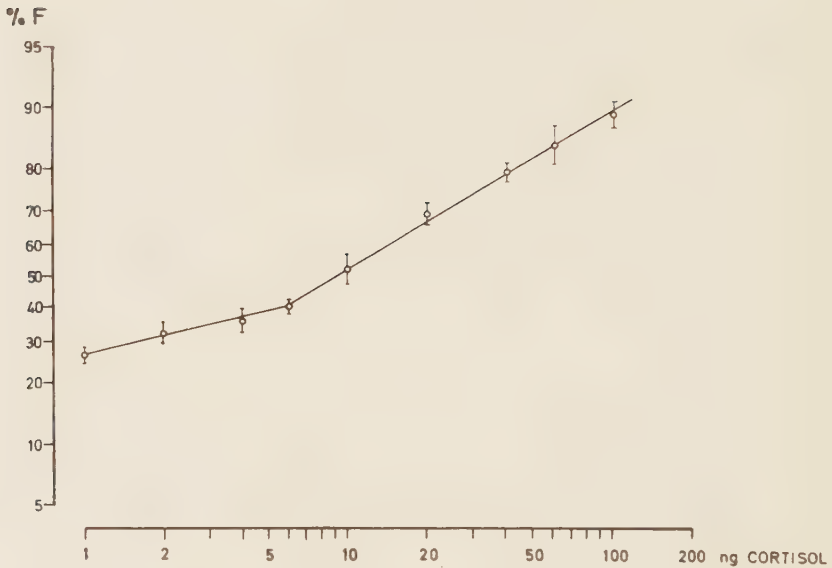


Abb.14a: Standardeichkurve für Cortisol
(Logit-Transformation)

Der freie Anteil (F) wurde in Prozent der Gesamtaktivität gegen den Cortisolgehalt des Ansatzes aufgetragen. CBG-Serum: M.K. nach Dexamethason, verdünnt 1 ad 45. Eingezeichnet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 10 Doppelbestimmungen.

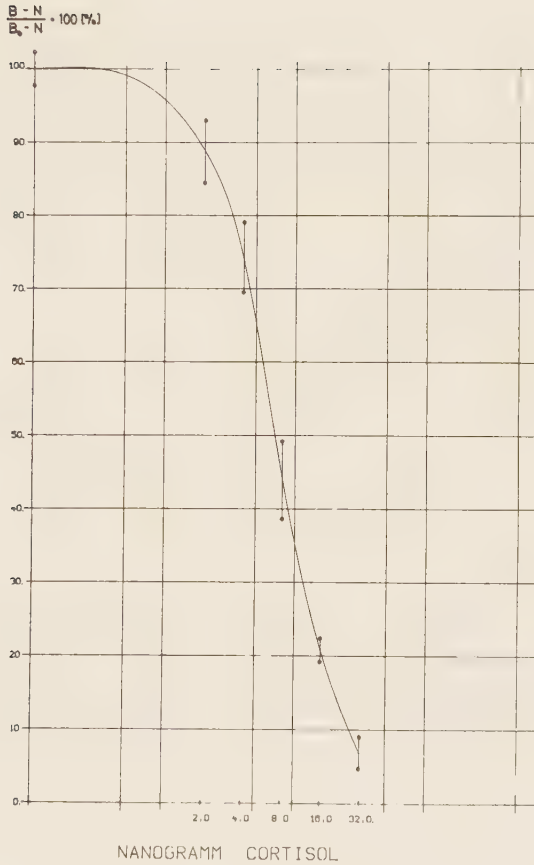


Abb.14b: Cortisol-Standardkurve

Berechnet und gezeichnet mittels einer Siemens 404/3 Datenverarbeitungsanlage und eines Hagen Graphomaten nach einem FORTRAN-Programm auf der Grundlage der Spline Approximation (46).

Ordinate: $\frac{B - N}{B_0 - N} \cdot 100\%$, Abszisse: Nanogramm Cortisol pro Ansatz

4.3.3 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der angegebenen Methode setzten wir wiederum an Stelle der kalten Cortisolstandards kalte Standards der Hormone Corticosteron, 11-Desoxycortisol, 17 α -Hydroxyprogesteron, Progesteron, Testosteron, Östradiol im Inkubationsgemisch ein (Abbildung 15). Im Vergleich mit den Spezifitätsuntersuchungen in Kapitel 3.2.6 fielen bei ungefähr gleicher Reaktion des Corticosterons eine wesentlich geringere Mitreaktion des Progesterons und des 17 α -Hydroxyprogesterons auf. Die Frage, inwieweit individuelle Unterschiede der einzelnen CBG-Seren die Spezifität einer CPBA beeinflussen, können wir nicht endgültig beantworten. Wir haben zwar ein weiteres CBG-Serum bei gleicher Verdünnung auf seine relative Bindungsaffinität zu den oben aufgeführten Hormonen untersucht und dabei ähnliche Ergebnisse gefunden. Diesen Versuchen kommt aber keine Beweiskraft zu, da objektive Angaben über den CBG-Gehalt der einzelnen Seren von uns nicht gemacht werden können. Die Hauptursache für die verminderte Reaktion des Progesterons und des 17 α -Hydroxyprogesterons in der CPBA - gleichbedeutend mit einer relativen Verbesserung der Spezifität - fanden wir bei der Untersuchung der Affinität der genannten Hormone zur Gelmatrix (Abbildung 16).

Es zeigte sich, daß Cortisol und Corticosteron fast identisch in ihren Elutionsprofilen sind, d.h. fast im gleichen Maße an die Gelmatrix reversibel adsorbiert werden. 11-Desoxycortisol wird erheblich stärker adsorbiert, während Progesteron und 17 α -Hydroxyprogesteron fast irreversibel an die Gelmatrix adsorbiert werden. Wie ein weiterer Versuch zeigte, konnte Progesteron auch nach einer Elutionszeit von 4 Std., bei einem Durchfluß von 0,25 ml/min nicht aus der Säule eluiert werden. Als Elutionsmittel wurde 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 verwandt.

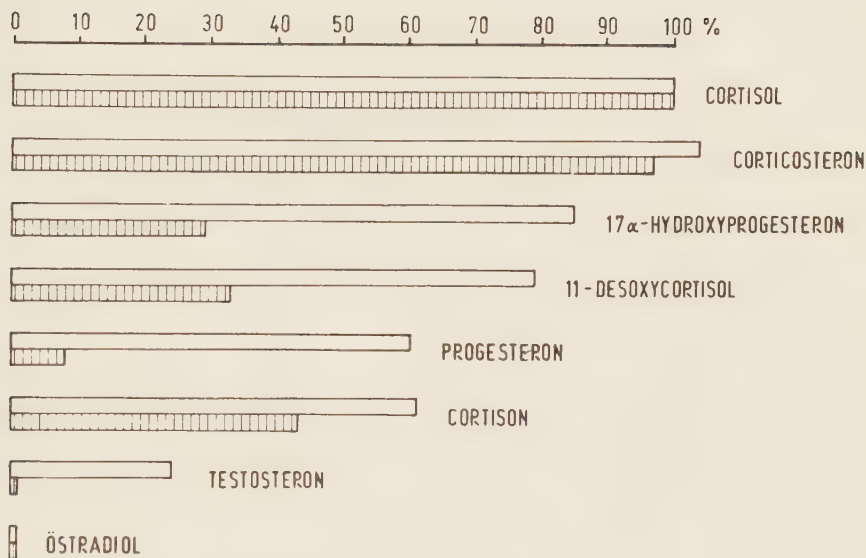


Abb.15: Vergleich der Spezifitätsuntersuchungen

Eingezeichnet sind die Mitreaktionen verschiedener Steroide in Prozent der Reaktion des Cortisols, bei der CPBA nach Extraktion mit Dichlormethan (weiße Säule) und bei der CPBA ohne vorherige Extraktion (schraffierte Säulen).

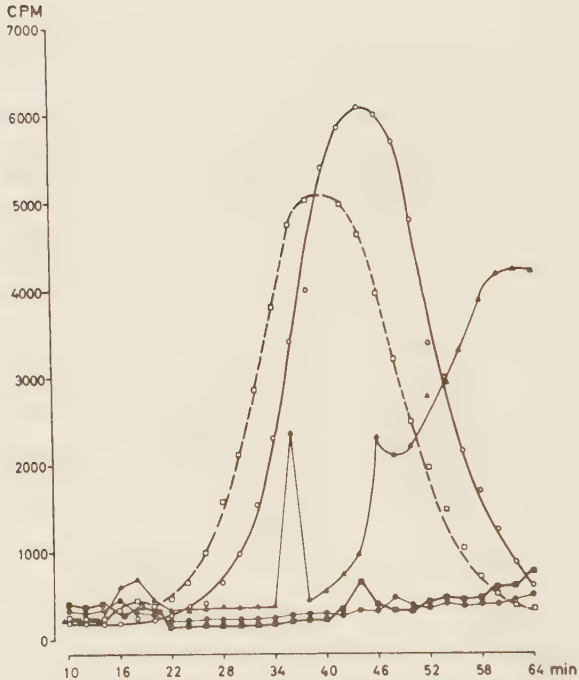


Abb.16: Verhalten verschiedener Steroide zu Sephadex G-10

Die Inkubationsgemische: 0,1 ml Serum + 0,1 ml N/10 HCl + 0,2 ml radioaktiver Standard der Hormone: Cortisol (○—○), Corticosteron (□—□), 11-Desoxycortisol (▲—▲), Progesteron (●—●), 17α-Hydroxyprogesteron (■—■) wurden auf eine saure (N/10 HCl, pH 1,0) Säule (2 g Sephadex G-10) aufgetragen und mit Tris/HCl-Puffer eluiert. Bei den kleinen Peaks handelt es sich wahrscheinlich um Oxydationsprodukte, die durch Autoirradiation entstanden sind.

Um einen etwaigen Einfluß des pH-Wertes auf die Adsorption von Progesteron zu untersuchen, wurden die Säulen über die genannte Zeit mit N/10 HCl und in einem weiteren Versuch

mit N/10 NaOH gespült. Auch bei diesen Extrema des pH-Wertes konnte die Elution nicht erreicht werden.

4.3.4 Wiederverwendbarkeit der Säulen

Nach dieser Feststellung mußte die Frage der Wiederverwendbarkeit der Säulen überprüft werden. Sowohl das zu untersuchende Serum, das CBG-Serum und das Nachwaschserum enthalten in nicht bekannten und meistens erheblich unterschiedlichen Konzentrationen Progesteron und 17α -Hydroxyprogesteron. Das im zu untersuchenden Serum vorhandene Progesteron geht mit ca. 8% in das Ergebnis ein (s. 4.3.3). Der auf der Säule verbliebene Rest wird zum größten Teil mit dem Nachwaschserum eluiert. Zur Kontrolle wurden Säulen mit 15 ng Progesteron (das entspricht dem Progesteron-gehalt in 0,2 ml Serum einer Patientin im 3. Trimenon graviditatis) beladen. Auf diesen Säulen wurde ein Testserum untersucht und das Ergebnis mit den Werten von neu zubereiteten Säulen verglichen. Wenn die mit Progesteron beladenen Säulen vorher mit 1,5 ml Nachwaschserum gespült wurden, konnte keine Beeinträchtigung des Meßwertes gefunden werden. Bei der Mehrfachbestimmung eines Testserums ($N = 5$) auf derselben Säule fanden wir überhaupt keinen Anstieg der Meßergebnisse.

4.4 Qualitätskontrolle

4.4.1 Sensitivität (Empfindlichkeit)

Mit der Zugabe von 1/2 ng Cortisol mit dem Tracer ist das System zwar nicht optimal empfindlich gestaltet. Die unterste Nachweisgrenze liegt bei Anwendung des 2s-Bereiches als Vertrauensgrenze bei 1 ng/o,1 ml oder 1 µg/100 ml, was für die klinischen Belange ausreichend ist.

4.4.2 Präzision (Genauigkeit)

Die Präzision wurde von MIDGLEY und seinen Mitarbeitern 1969 (49) als das Maß definiert, in dem eine bestimmte Anzahl von Messungen mit dem Mittelwert übereinstimmen. Da die Präzision einer Messung sowohl vom Slope als auch vom Meßwert abhängt, muß die Präzision einer Eichkurve an mehreren Punkten angegeben werden.

Bei Doppelbestimmungen folgender Eichkurvenpunkte ergaben sich die Variationskoeffizienten:

2 ng, VK. 45%, 4 ng VK. 37%, 6 ng VK. 12%, 10 ng VK. 16%, 20 ng VK. 16%, 40 ng VK. 13%.

Weiter wurde bei jedem Durchgang ein gepooltes Kontrollserum untersucht (Reproduzierbarkeit, Qualitätskontrolle von Tag zu Tag). Der Mittelwert lag bei: $14,2 \pm 1,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$). Der Variationskoeffizient betrug: 12,1 % (N=46).

4.4.3 Wiederfindeversuch (Richtigkeit)

Die Wiederfindequoten für eine bekannte Menge kalten Cortisols, die sowohl den Eichstandards als auch Serum zugesetzt wurde, ergaben in einem Bereich von 5 - 20 ng $96 \pm 5\%$ ($\bar{x} \pm s$). Die Verluste während des Versuches waren

gering, weil mit dem beschriebenen System die Verluste bei der Extraktion und dem Wiederaufnehmen vermieden werden können. Die Verdünnungen des Normalserums und einiger Seren von Patienten nach einer ACTH Infusion ergaben Slopes, die mit dem der Eichkurve identisch waren.

4.5 Ergebnisse

4.5.1 9 Uhr Nüchternwerte Normalpersonen

Untersucht wurden die 9 Uhr Nüchternwerte stoffwechselgesunder Angehöriger des Klinikpersonals und nicht endokrin erkrankter Patienten. Bei einer logarithmischen Normalverteilung fanden wir Cortisolspiegel mit einem Mittelwert von $11,1 \pm 3,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$).

In diesem Kollektiv (N=68) lag der höchste Wert bei $20,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, der niedrigste Wert war $4,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol.

4.5.2 ACTH-Belastungstest bei Normalpersonen ACTH-Kurztest

Der bisher an der Klinik durchgeführte ACTH-Belastungstest wurde bereits in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben. Die lange Laufzeit der Infusion (4 Std.) macht aber seine Anwendung in der Ambulanz nahezu unmöglich. Von daher kommt der Wunsch nach einem Kurztest, der ohne großen Aufwand an Zeit durchführbar sein sollte (8,42,48,88,90).

Um das Verhalten der peripheren Cortisolspiegel nach einer einmaligen Injektion von Synacthen zu untersuchen, wurden einem Kollektiv von 19 Patienten $0,25 \text{ mg}$ Synacthen i.v. nach der Entnahme des 9 Uhr Nüchternwertes verabreicht. Weitere Blutentnahmen erfolgten 30,60,90,120 und 180 Minuten nach der Injektion.

Als Referenzmethode diente eine modifizierte fluorimetrische Methode nach SPENCER - PEET (75,85), die es erlaubt, die 11-OH-Corticosteroide nach Extraktion mit Dichlormethan mit einem Äthanol-Schwefelsäuregemisch als Fluorogen zu messen (Abbildung 17).

Zum Vergleich führten wir bei den gleichen Patienten den üblichen ACTH-Infusionstest (s.oben) durch. Um eventuelle gegenseitige Beeinflussungen der Teste ausschließen zu können, führten wir bei 10 Patienten den Infusionstest bereits einige Tage vor der fraktionierten Untersuchung durch, während bei den restlichen Patienten die Tests in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt wurden. Es zeigte sich, daß die Ergebnisse unabhängig von der Reihenfolge der Teste waren.

Sowohl die 9 Uhr Nüchternwerte (Nullwert) bei der fraktionierten Untersuchung als auch die 9 Uhr Nüchternwerte (A-Wert) beim herkömmlichen ACTH-Infusionstest lagen mit $13,4 \pm 3,6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$) bzw. $13,6 \pm 3,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$) gering über dem Mittelwert des Normalkollektivs.

Bei der fraktionierten Untersuchung fanden wir einen kleinen Gipfel der Cortisolsekretion nach 30 Minuten ($29,6 \pm 8,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) ($\bar{x} \pm s$) und das Maximum bei 120 Minuten ($35,0 \pm 10,9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) ($\bar{x} \pm s$), ohne daß sich die Werte zwischen der 30. und der 120. Minute signifikant unterschieden. Für den Einsatz in der klinischen Ambulanz haben wir vorgeschlagen, den zweiten Wert 60 Minuten nach der Injektion von 0,25 mg Synacthen zu entnehmen, da zu diesem Zeitpunkt sicherlich der Cortisolanstieg zu erfassen ist und andererseits ein längeres Warten für den Patienten einen Zeitverlust darstellen würde, ohne bessere Test-Aussage.

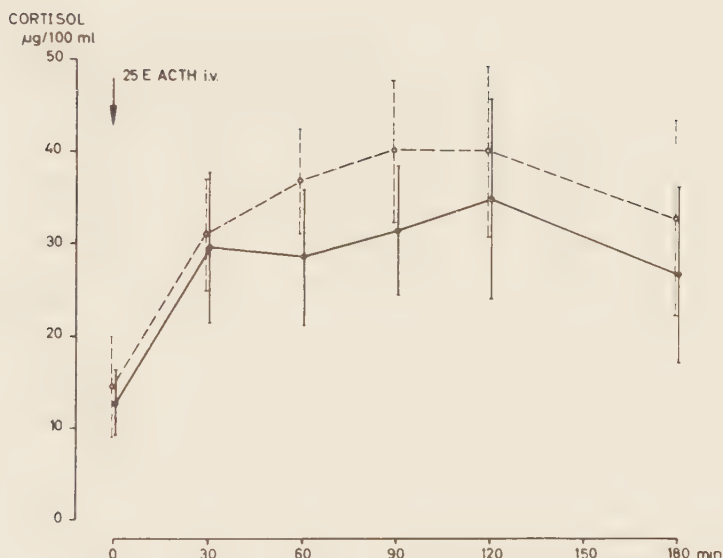


Abb.17: Periphere Cortisolspiegel nach einer einmaligen Injektion von 0,25 mg Synacthen
Eingezeichnet sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Werte von 19 Patienten, bestimmt mit Hilfe der CPBA (●—●) und mit der fluorimetrischen Methode (○—○).

Beim herkömmlichen ACTH-Test fanden wir nach der vierstündigen Infusion $32,8 \pm 7,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$) mit der CPBA, während die Anwendung der fluorimetrischen Methode $50,5 \pm 9,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol bei einem Ausgangswert von $15,1 \pm 8,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$) ergab (Abbildung 18).

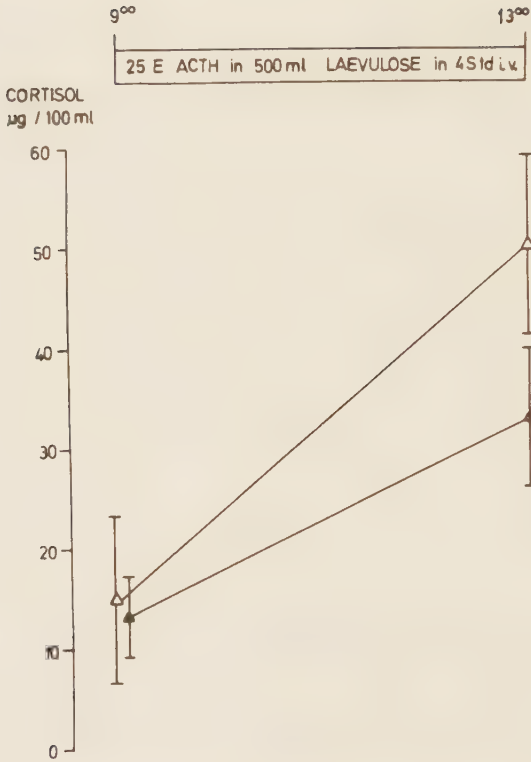


Abb.18: Periphere Cortisolspiegel ($\bar{x} + s$) nach einer Infusion von 0,25 mg Synacthen in 500 ml Laevulose über vier Stunden

Die Werte wurden mit Hilfe der CPBA (▲—▲) und mit Hilfe der fluorimetrischen Methode (△—△) bestimmt.

4.5.3 Dexamethason Suppressionstest

Normalpersonen

Über das methodische Vorgehen beim Dexamethason Suppressionstest wurde bereits in Kapitel 2.6.2.2 berichtet. Untersucht wurden 14 Seren von Normalpersonen, die am Vorabend 2 mg Dexamethason eingenommen hatten. Als Mittelwert fanden wir $2,6 \pm 0,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm s$). Der Normalbereich errechnete sich zu: $1,0 - 4,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol ($\bar{x} \pm 2s$).

4.5.4 Beurteilung

Insgesamt zeigte sich, daß die mit der Competitiven Proteinbindungs-Analyse (CPBA) gemessenen Werte deutlich niedriger sind, als die mit Hilfe der fluorimetrischen Methode bestimmten Werte. Das liegt vor allen Dingen an der nur gering von der Reaktion des Cortisols unterschiedenen Reaktion des Corticosterons in der Competitiven Proteinbindungs-Analyse (s. 4.3.3). In die Werte der fluorimetrischen Methode dagegen geht Corticosteron gegenüber Cortisol mit dem Faktor 3 ein (76). Bei der Bestimmung der peripheren Cortisolspiegel nach einer einmaligen Injektion von 0,25 mg Synacthen fanden wir, daß die Differenz zwischen den mit der Competitiven Proteinbindungs-Analyse und den mit der fluorimetrischen Methode gemessenen Werten nicht konstant bleibt (Abbildung 17).

Aus den Untersuchungen von NABORS et al. ist die vermehrte Sekretion von Corticosteron nach i.V. Injektion von ACTH bekannt (64). Unter Berücksichtigung der vermehrten Mitreaktion des Corticosterons in der fluorimetrischen Methode läßt sich deshalb die Zunahme der Differenz erklären.

Die nach Suppression mit 2 mg Dexamethason gemessenen Werte liegen deutlich unterhalb des Normalbereichs für die

9 Uhr Nüchternwerte. Bei dieser Kurzform des Dexamethason Suppressionstests werden immer noch geringe Mengen von Cortisol sezerniert. Erst nach mehrtägiger Suppression mit der genannten Dosis wäre ein vollständiger Stillstand der Cortisolausschüttung zu erreichen.

Der von uns angegebene Normalbereich von $4,5 - 20,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol, mit einem Mittelwert von $11,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ steht in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren, die eine Competitive Proteinbindungs-Analyse anwenden, wie z.B. FRASER und JAMES (30), die einen Normalbereich von $3,1 - 20,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Cortisol mit einem Mittelwert von $9,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ fanden. ITURZAETA et al. (40) geben als Mittelwert $11,7 \pm 3,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$), NEWSOME et al. (66) $12,3 \pm 0,8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($\bar{x} \pm s$) für ihre Normalbereiche an.

5 DISKUSSION

5.1 Das sogenannte freie ^3H -Cortisol

Der Cortisolspiegel im Blut hängt von drei Faktoren ab:

- a. der adrenocorticalen Sekretionsrate
- b. der Verteilung zwischen dem intravaskulären und dem extravaskulären Volumen
- c. der Ausscheidung.

Für die Frage der biologischen Aktivität ist vor allem die Verteilung von Bedeutung. Mit Injektionen von ^{14}C -Cortisol im Tracerbereich konnte gezeigt werden (69), daß eine Verteilung zwischen vaskulären und extravaskulären Kompartimenten stattfindet. Es sind einige Faktoren des intravaskulären Kompartiments bekannt, die die Verteilung beeinflussen. Vor allem steht hier die Proteinbindung (s. EINLEITUNG) im Vordergrund. Zusätzlich wird Cortisol an die Erythrocyten adsorbiert und in geringem Maße binden auch die Leucocyten Cortisol, während die Plättchen keine Adsorption von Cortisol zeigen (4).

Dagegen weiß man bisher wenig über das extravaskuläre Kompartiment und die Faktoren, die dort wirksam sind. Berechnungen des austauschbaren Cortisols haben ergeben, daß beträchtlich mehr als 50% außerhalb der Gefäße lokalisiert sind. Demgemäß mußte für einige Gewebe eine höhere Affinität zum Cortisol postuliert werden (81).

Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die Mitochondrienfraktionen von Lebergewebe Cortisol in weit größerem Umfang binden als Kern- und Mikrosomenfraktionen des gleichen Gewebes und daß mitochondriale Enzyme mit dem Cortisol um die Bindungsplätze am CBG kompetitieren (23).

Es ist offensichtlich, daß der größte Teil des Cortisols im extravaskulären Kompartiment von Geweberezeptoren gebunden wird. Das beweisen die relativ geringen Konzentrationen von Cortisol im Liquor und in der Lymphe. Aber

auch dort konnte, wenn auch in geringeren Konzentrationen als im Serum CBG nachgewiesen werden (43).

Nach heutiger Auffassung ist nur der geringe Teil des im Serum nicht an Proteine gebundenen Cortisols biologisch aktiv, denn nur dieser kann zwischen dem intra- und dem extravaskulären Raum ausgetauscht werden und so die Geweberezeptoren erreichen.

Die Bestimmung des sogenannten freien ^3H -Cortisols sollte nun eine Möglichkeit sein, die Größe der biologisch aktiven Form abzuschätzen. Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse sind das Produkt dreier Faktoren:

- a. der CBG-Konzentration
- b. des Cortisolspiegels
- c. der experimentellen Bedingungen (s. 2.1 - 2.4).

Selbst wenn es gelingt, durch die Automatisierung (s. 2.5) alle Faktoren konstant zu halten, die die Dissoziation des CBG-Cortisol Komplexes bzw. die reversible Adsorption des Cortisols an die Gelmatrix beeinflussen, sind immer noch die anderen zwei Parameter offen, die in das Ergebnis eingehen.

Diese Methode kann und soll deshalb sinnvoller Weise nur angewandt werden:

- a. als zusätzliche Untersuchung neben der Absolutwertbestimmung (z.B. fluorimetrische Cortisolbestimmung oder Competitive Proteinbindungs-Analyse) bei Verdacht auf eine Veränderung der Proteinbindungsverhältnisse (z.B. Schwangerschaft)
- b. als alleinige Methode lediglich in der Funktionsdiagnostik (z.B. ACTH-Test).

Die Methode stellt aber in beiden Fällen keinesfalls eine Messung des in vivo ungebundenen Cortisols dar.

Für die Anwendung in beiden Bereichen ist die Wahl der experimentellen Bedingungen wegen der Relativität der Er-

gebnisse völlig unkritisch. Wesentlich ist allerdings die Konstanz. Ein Anliegen dieser Arbeit war deshalb die Automatisierung, durch die neben einer Kapazitätsausweitung eine bessere Standardisierung erreicht werden konnte. Der erhaltene Variationskoeffizient von knapp unter 5% beweist die gute Reproduzierbarkeit der Methode.

Bei Verdacht auf eine Veränderung der Proteinbindungsverhältnisse ergibt sich folgendes Überlegungsschema:

Ein Ergebnis, das im Normalbereich liegt, ist ein Hinweis dafür, daß das Verhältnis zwischen dem proteingebundenen und dem freien Anteil nicht verändert ist, schließt aber eine gleichzeitige Erhöhung oder Erniedrigung sowohl des freien als auch des proteingebundenen Cortisols nicht aus. Dieser Fall dürfte aber relativ unwahrscheinlich sein. Ein gegenüber dem Normalbereich erniedrigtes Ergebnis ist ein Hinweis entweder auf eine Erhöhung des CBG-Gehaltes bei normalem Absolutwert oder auf eine Erniedrigung des Absolutwertes bei normalem CBG-Gehalt. Bei einem erhöhten Ergebnis liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Zusätzlich muß mit der Absolutwertbestimmung eine der Möglichkeiten verifiziert werden, da zwei Parameter innerhalb des Systems unbekannt sind.

Tabelle 1 faßt alle Interpretationsmöglichkeiten der Werte des sogenannten freien ^3H -Cortisols unter Berücksichtigung der Absolutwerte zusammen. Es kann also in der Regel aus Absolutwert und sogenanntem freien ^3H -Cortisol auf den CBG-Gehalt des Serums geschlossen werden.

	Sog.freies ³ H-Cortisol: normal	Sog.freies ³ H-Cortisol: erhöht	Sog.freies ³ H-Cortisol: erniedrigt
Absolut- wert: normal	CBG normal	CBG erniedrigt	CBG erhöht
Absolut- wert: erhöht	CBG erhöht	CBG erhöht ⁺ CBG normal* CBG erniedrigt ⁺	CBG erhöht*
Absolut- wert: erniedrigt	CBG erniedrigt	CBG erniedrigt	CBG erhöht ⁺ CBG normal* CBG erniedrigt ⁺

Tab.1: Zusammenstellung der möglichen Aussagen über den CBG-Gehalt bei Kenntnis des Absolutwertes und des sogenannten freien ³H-Cortisols.

* = Klinisch häufige Fälle,

⁺ = Klinisch seltene Fälle, aber theoretisch durchaus vorstellbar.

In zwei Fällen, nämlich wenn sowohl der Absolutwert als auch der Wert des sogenannten freien ³H-Cortisols erhöht oder erniedrigt sind, kann theoretisch nicht eindeutig auf die CBG Konzentration geschlossen werden. Mit größter Wahrscheinlichkeit darf man allerdings in diesen Fällen, wenn nicht Antioovulantien eingenommen werden oder eine Dysproteinämie oder eine Nephrose vorliegt, die CBG Konzentration als normal voraussetzen.

Die Problematik bei der Anwendung des sogenannten freien ³H-Cortisols für die Frage der biologischen Aktivität liegt darin, daß der Körper nicht auf ein konstantes Verhältnis zwischen proteingebundenem und freiem Anteil mit seinen

Regelmechanismen reagiert, sondern mit größter Wahrscheinlichkeit alleine das tatsächlich ungebundene Cortisol konstant hält. Der Index des freien Cortisols - entsprechend dem Index der freien Schilddrüsenhormone (38) - , der sich aus der Multiplikation des sogenannten freien ^3H -Cortisols mit dem Absolutwert ergibt, ist deshalb eine notwendige rechnerische Größe bei der Beurteilung der biologischen Aktivität.

Bei der Anwendung in der Funktionsdiagnostik kann die Bestimmung des sogenannten freien ^3H -Cortisols die Messung der Absolutwerte ersetzen. Weder beim Stimulationstest mit ACTH noch beim Suppressionstest mit Dexamethason wird die CBG Konzentration während des Tests verändert (21). Das Ergebnis ist dann alleine eine Funktion des endogenen Cortisolspiegels. In diesem Fall kann die Bestimmung des sogenannten freien ^3H -Cortisols mit den Werten vor und nach Gabe eines Stimulans oder eines Suppressors als der Trivialfall einer CPBA interpretiert werden. Die beiden Meßwerte sind Punkte einer Eichkurve, für die der konstante CBG-Gehalt das spezifische Reagens ist.

Probleme ergeben sich allerdings beim Vergleich der Stimulations- und Suppressionsversuche verschiedener Patienten. Aus den Versuchen mit der CPBA wissen wir, daß die CBG Konzentration im Reaktionsansatz wesentlich für die Steilheit der Eichkurve verantwortlich ist. Wenn also durch Vergleich mit Normalkollektiven auf den Grad der Funktionsreserve oder des Funktionsverlustes geschlossen werden soll, muß eine sehr genaue Übereinstimmung der CBG Konzentrationen gefordert werden, da sonst gleichen Veränderungen des sogenannten freien ^3H -Cortisols verschiedene Veränderungen der Absolutwerte entsprechen.

Die klinische Brauchbarkeit ist, bei Berücksichtigung der oben genannten klinischen Diagnosen, wegen der sonst guten Übereinstimmung der CBG Konzentrationen nicht eingeschränkt.

Insgesamt zeigt diese Methode große Ähnlichkeit mit dem Hamolsky-Test für Trijodthyronin (33), und geht bei der Anwendung in der Funktionsdiagnostik von der gleichen Voraussetzung aus, nämlich daß die Bindungskapazität unverändert bleibt. Der Hamolsky-Test, bei dem die in vitro Aufnahme von T_3 durch die roten Blutzellen ein Maß für den Funktionszustand der Schilddrüse ist, wurde von MICHELL et al. 1960 durch die Einführung von Ionenaustauscherteilchen an Stelle der Erythrocyten wesentlich vereinfacht. FARESE und PLAGER berichteten 1962 über die in vitro Aufnahme von Cortisol- ^{14}C durch Erythrocyten und die Abhängigkeit von der CBG Konzentration und dem Plasmaspiegel (28). Ihre Ergebnisse zeigten allerdings innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite keine ausreichenden Veränderungen, um die Methode bei der Funktionsdiagnostik anwenden zu können.

NAKAJIMA et al. führten 1968 die in vitro Aufnahme von 3H -Prednisolon durch Amberlite CG 400 Type 1 als Maß für den Funktionszustand der Nebennierenrinde ein (65).

Die Entwicklung des 3H -Cortisol-uptake Tests in unserem Labor geht zurück auf die Arbeiten von MÜLLER-BARDORFF und THIELE, die die Proteinbindungsverhältnisse bei verschiedenen Funktionszuständen der Nebennierenrinde mit Hilfe der Dextrangelfiltration über Sephadex G-10-Säulen untersuchten(35). Bei den damaligen Versuchen konnten aber einige Fehlermöglichkeiten nicht ausgeschlossen werden. Wesentlich dürften vor allem die fehlende Temperaturkonstanz sowie die Ungenauigkeiten bei den Aufbereitungsschritten für die Flüssigkeitsscintillationsspektrometrie (Extraktion der Eluate mit Dichlormethan, Absaugen des wässrigen Überstandes) beteiligt gewesen sein. Daneben war die für die Bestimmung notwendige Serummenge, bedingt durch die Größe des Säulenvolumens, erheblich

größer als bei dem Trennungsvorgang über Sephadex G-50-Säulen.

Deshalb versuchten wir im Rahmen der Automatisierung dieser Methode die genannten Fehlermöglichkeiten zu beseitigen, bzw. durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen wie z.B. den Einsatz wasserlösender Scintillationsgemische und die Verwendung von Sephadex G-50 als Gelmatrix diese Fehlermöglichkeiten zu umgehen.

Bei der Automatisierung konnten wir auf die von HORN und HENNER (37) bei einem halbautomatisierten T_3 -uptake Test gemachten Erfahrungen zurückgreifen. ✓

Die beschriebene Methode ist leicht durchführbar. Es werden 0,2 ml Serum benötigt. In einem Durchgang können gleichzeitig 12 Seren als Doppelwerte bestimmt werden. Der Trennungsvorgang ist automatisiert und dadurch gut standardisiert. Er dauert insgesamt 16 Minuten. Die Methode ist billig, da die Säulen immer wieder verwendet werden können und durch die Automatisierung eine große Probenzahl pro Tag bestimmt werden kann. Eine technische Assistentin kann 150 Proben pro Tag bestimmen.

5.2 Competitive Proteinbindungs-Analyse

Seit den grundlegenden Arbeiten von BERSON und YALOW, UNGER, EKINS und MURPHY hat sich die Competitive Proteinbindungs-Analyse als ein wesentlicher methodischer Fortschritt auch auf dem Gebiet der Steroidanalytik erwiesen. Für die Bestimmung der Plasmacortisolspiegel hat sich das CBG als spezifisches Reagens durchgesetzt. Seren mit einem hohen CBG-Gehalt sind leicht zu gewinnen von Patientinnen, die entweder schwanger sind, oder mit Östrogenen behandelt werden. Das in kleinen Aliquots eingefrorene Serum ist lange haltbar. Wenn radioaktive Cortisolstandards mit relativ hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung stehen, kann man auf die Gabe von Dexamethason am Vorabend der Blutentnahme verzichten. Bei weniger hoch markierten Präparaten muß man die endogene Cortisolproduktion unterdrücken, damit nicht durch den Zusatz von kaltem Hormon mit dem radioaktiven Tracer bereits eine Competition stattfinden kann und so der Leerwert unnötig angehoben wird. Theoretisch wäre ein durch den radioaktiven Standard eben abgesättigtes System wünschenswert. Bei einem nicht abgesättigten System wird die Eichkurve zunächst horizontal verlaufen, weil trotz Zusatz von kaltem Hormon keine Verdrängung stattfinden kann .

Andere Autoren (84) schlagen vor, das endogene Cortisol durch Adsorbentien oder durch vorhergehende Gelfiltration unter Schonung der spezifischen Proteine zu entfernen. Dadurch sei die Verwendung eines jeden in der Routinediagnostik angefallenen Serums möglich und erfordere nicht die Blutentnahme bei Schwangeren oder bei Patientinnen, die mit Antiovalantien behandelt werden.

Die Konzentration des endogenen Cortisols im CBG-Serum ist deshalb von Bedeutung, weil sie die Sensivität des Assays und damit den Meßbereich bestimmt.

Bei einem Assaysystem mit vorheriger Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (s. 3) kann man bei hoch markierten radioaktiven Präparaten durch Zusatz von kaltem Cortisol zum CBG-Ansatz fast immer optimale Bedingungen für die Empfindlichkeit erhalten (41).

Bei unserer Methode einer CPBA auf der Säule (s. 4) sind wir auf Seren mit einem hohen CBG-Gehalt angewiesen und haben deshalb immer Serum verwandt, das von Patientinnen stammte, die mit Östrogenen behandelt wurden und bei denen die endogene Cortisolproduktion durch Gabe von Dexamethason supprimiert wurde. Der Grund hierfür liegt in der relativ sehr kurzen "Inkubationszeit" des Cortisols mit dem CBG, da diese Reaktion ("Inkubation") direkt auf der Säule stattfindet. Insgesamt sind hier die Verhältnisse etwas schwieriger zu übersehen.

Das auf Grund der reversiblen Adsorption relativ langsam durch die Säule wandernde Cortisol wird von dem spezifischen Reagens überholt und belädt sich mit dem radioaktiven Tracer und kaltem Hormon in Abhängigkeit von der gesamten vorhandenen Menge. Wenn man die von MURPHY angegebene Reaktionszeit (s.2.2.4.1) von wenigen Sekunden bis Minuten zu Grunde legt, darf man bei einem Durchfluß von 0,25 ml/min und einer Temperatur von 26°C annehmen, daß sich ein Gleichgewicht zwischen dem spezifischen Reagens (CBG) und dem Hormon eingestellt hat. Auch hier bringt eine weitere Verdünnung des CBG-Serums zwar eine Verbesserung der Sensivität, aber eine Einschränkung des Meßbereiches.

Die wichtige Frage der Sensivität (Empfindlichkeit) haben wir bereits kurz bei der Wahl des spezifischen Reagens gestreift, vor allen Dingen unter Berücksichtigung des gewünschten Meßbereichs einer Methode. EKINS (27) definierte die Empfindlichkeit einer Methode als die geringste

meßbare Menge, die von Null unterschieden werden kann. Die Empfindlichkeit entspricht damit der Präzision des Nullpunktes und wird mit der Standardabweichung oder einem Vielfachen davon aus mehreren Leerwertbestimmungen angegeben. BERSON und YALOW (92) dagegen definierten die Sensivität nicht als unterste Nachweisgrenze, sondern als den Slope der Eichkurve und bezeichneten unter Berücksichtigung des statistischen Fehlers das Produkt aus dem Slope und dem Fehler als die kleinste voneinander unterscheidbare Menge. Der steile Teil (= empfindlichste) der Eichkurve kann durch Verdünnung immer mehr zu geringeren Konzentrationen hin verschoben werden. Mit zunehmender Verdünnung nimmt allerdings die Assoziationskonstante des CBG-Cortisol Komplexes ab. Die erreichbare Empfindlichkeit ist also im wesentlichen eine Funktion der Assoziationskonstanten. Ein weiterer limitierender Faktor ist die spezifische Aktivität des Tracers, denn die mit dem Tracer zugesetzte Menge an Cortisol darf die Zahl der vorhandenen Bindungsplätze nicht übersteigen. Sicherlich bringt diese CPBA auf der Säule einen erheblichen Empfindlichkeitsverlust gegenüber den Assays mit anderen Trennungsschritten. Aber die Empfindlichkeit ist ausreichend, da man mit 50 - 100 μ l Serum zur Bestimmung auskommt.

Die Präzision unserer Methode wird von mehreren Faktoren beeinflusst: dem Zählfehler, der durch die Begrenzung der Zählzeit und die spezifische Aktivität des radioaktiven Standards entsteht. Im allgemeinen reicht ein Zählfehler von 1% aus und es bringt keinen Vorteil, den Zählfehler weiter absenken zu wollen, da individuelle und andere technische Fehler nicht weiter gesenkt werden können.

Ebenso wie die Sensitivität ist auch die Präzision in hohem Maße eine Funktion der Assoziationskonstanten des

CBG-Cortisol Komplexes. Deshalb sind auch hier unsere Ergebnisse nicht optimal.

Auf die Frage der Spezifität sind wir bereits in Kapitel 4 ausführlich eingegangen. Zusammenfassend müssen wir hier feststellen, daß die Spezifität eine Funktion der Affinität der competitiven Analoge zum CBG und in unserem Fall zum trennenden System (Säule) ist. Die Spezifitätsuntersuchungen müssen bei jeder Änderung des Trennungssystems neu durchgeführt werden und Angaben über die Affinität verschiedener Steroide zum CBG können nur unter Berücksichtigung des Trennungssystems (bei der Säule: Gel-Art) verglichen werden. Ob das Trennungssystem Sepadex G-10 oder Sephadex G-50 ist, bedeutet bezüglich der Mitreaktion der competitiven Analoge keinen qualitativen aber einen quantitativen Unterschied. Jedoch darf daraus nicht der Einsatz der Methode für die spez. Bestimmung des Cortisols hergeleitet werden.

Bei der Beurteilung der Brauchbarkeit müssen neben den oben genannten Kriterien noch weitere Faktoren berücksichtigt werden. MURPHY (63) hat für die klinische Eignung einer Methode fünf Voraussetzungen gefordert:

1. Sie darf nicht oder nur in seltenen Fällen durch Medikamente beeinflusst werden,
2. sie muß schnell durchzuführen sein, d.h. die Ergebnisse müssen möglichst noch am gleichen Tag abgerufen werden können,
3. sie muß so empfindlich sein, daß die erforderliche Serummenge klein gehalten werden kann,
4. sie muß möglichst leicht durchzuführen sein,
5. sie muß vergleichsweise billig sein.

Eine Möglichkeit, die die meisten der genannten Punkte positiv beeinflussen kann, ist eine Automatisierung. Eigentlich kann man bei unserem System (s. 4) nicht von einer vollautomatisierten Methode sprechen. Es fehlt die für die Vollautomatisierung notwendige Rückkoppelung zwischen dem Ergebnis und dem Vorgang der Analyse. Im deutschen Sprachgebrauch hat sich allerdings der Begriff Analysenautomat oder Halbautomat für Geräte eingebürgert, die Methoden, die auch manuell durchgeführt werden können, mechanisiert ausführen. Man müßte also genauer von einer Mechanisierung statt von einer Automatisierung sprechen. Solche mehr oder weniger mechanisierten Arbeitsabläufe haben den Vorteil, daß manuelle Arbeitsschritte, die entweder zum vorhergehenden oder nachfolgenden mechanisierten Arbeitsvorgang gehören, zwischenzeitlich ausgeführt werden können, z.B. die Zentrifugation des Blutes, die Inkubation des Serums mit dem radioaktiven Tracer, der Zusatz des Szintillationsgemisches zu den Eluat, das Einbringen der Proben in den Zähler sowie die Auswertung. Wenn auch für die meisten dieser manuellen Schritte Hilfsmittel z.B. Pipettierautomat, Zipette, Tischrechner Olivetti P 102 zur Verfügung stehen, müßten andererseits diese manuellen Arbeitsschritte weiter vermindert bzw. vollständig vermieden werden, um die Mechanisierung zur Vollautomatisierung weiterführen zu können.

Der jetzt erreichte Grad der Automatisierung bringt für Cortisol erstmals die Möglichkeit, die Gewinnung der zu messenden Substanz aus dem Serum, die Reaktion mit dem spezifischen Reagens und die Trennung der proteingebundenen und der freien Fraktion automatisiert ablaufen zu lassen. Damit werden alleine vier Arbeitsschritte, die alle potentielle Fehlerquellen darstellen, nämlich die Extraktion mit dem Lösungsmittel, das Absaugen des Über-

standes oder die Entnahme eines Aliquots aus dem Extrakt, das Abdampfen des Extraktionsmittels und das Wiederaufnehmen der Trockne vermieden.

Andererseits sind zum jetzigen Zeitpunkt zur Ausschaltung von Fehlern, wie z.B. an Pumpe und Schläuchen, noch weitere methodische Verbesserungen möglich. Eine Ausdehnung dieses Methodenprinzips auf andere Bestimmungen, z.B. die radioimmunologische Bestimmung des Cortisols mit AK, ist durchaus denkbar und sollte untersucht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine Methode zur Bestimmung des im Serum nicht an Proteine gebundenen Anteils von Cortisol vorgestellt. Dazu wird Serum mit radioaktivem Cortisol als Tracer inkubiert und durch Säulenchromatographie über Sephadex G-50 superfine der proteingebundene vom freien (sogenanntes freies ^3H -Cortisol) getrennt. Diese Methode wird als simultane Säulenchromatographie (25 Säulen gleichzeitig) mit einem halbautomatischen Analysengerät durchgeführt. Die klinische Brauchbarkeit wird an Hand von Ergebnissen gezeigt und die Aussagemöglichkeiten bei gleichzeitiger Kenntnis des Absolutwertes diskutiert.

2. Unter Ausnützung des genannten Automatisierungsprinzips für die Trennung von proteingebundener und freier Fraktion, wird eine Competitive Proteinbindungs-Analyse für Cortisol nach Extraktion mit Dichlormethan aus dem Serum beschrieben. Für die Verbesserung der Spezifität werden Vorversuche zur Trennung kompetitiver Analoge des Cortisols erwähnt. An den methodischen Schwierigkeiten wird der Wunsch erläutert, den Extraktionsschritt in den automatisierten Vorgang mit einzubeziehen.

3. Eine Competitive Proteinbindungs-Analyse ohne vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wird dargestellt. Dazu wird das Inkubationsgemisch (Serum und radioaktiver Tracer) unter Zusatz von N/10 HCl auf eine sauer äquilibrierte Säule (Sephadex G-10) aufgetragen. Das aus den Proteinbindungen freigesetzte Cortisol und der Tracer werden reversibel an die Gelmatrix adsorbiert. Dann wird umgepuffert und mit CBG-Serum eluiert (proteingebundene Fraktion). Der auf der Säule verbliebene Anteil (freie Fraktion) wird mit Nachwasch-

serum ausgewaschen. Es werden also auf der selben Säule die entscheidenden drei Schritte einer CPBA durchgeführt, nämlich die Extraktion, die Reaktion mit dem spezifischen Reagens (CBG-Serum) sowie die Trennung von proteingebundenem und freiem Anteil. Dadurch ist es möglich, diese Methode ebenfalls zu automatisieren. Erste klinische Ergebnisse werden mitgeteilt und die Methode bezüglich Empfindlichkeit, Präzision, Richtigkeit, Spezifität und Brauchbarkeit diskutiert.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. ANTONIADES, H.N., R.B.PENNEL, W.R.SLAUNWHITE Jr. and A.A.SANDBERG: Binding and distribution of intravenously injected ^{14}C -steroids and their metabolites in human plasma and its fractions.
J. Biol. Chem. 229, 1071 (1957b).
2. BARAKAT, R.S. and R.P.EKINS: Assay of vitamin B_{12} in blood.
Lancet 2, 25 (1961).
3. BAULIEU, E.E., J.P.RAYNAUD and E.MILGROM: Measurement of steroid binding proteins. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology.
Vol: II Steroid Assay by Competitive Protein Binding. Acta endocr. (Kbh) Suppl. 147, 104.
4. BEISEL, W.R., V.C.DI RAIMONDO and P.H.FORSHAM: Cortisol transport and disappearance.
Ann. intern. Med. 60, 641 (1964b).
5. BENNHOLD, H.: Über die Vehikelfunktion der Serumeiweißkörper.
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 42, 237 (1932).
6. BOOTH, M., P.F.DIXON, C.H.GRAY, J.GREENAWAY and H.J.HOLNESS: Protein binding of cortisol in health and in pregnancy.
J. Endocr. 23, 25 (1961).

7. BOSS,N.: Quantitative Bestimmung der suppressiven Wirkung synthetischer Corticoide am Menschen durch Beobachtung des Tagesrhythmus von Serumcortisol nach einer einzelnen oralen Dosis von Prednisolon oder Fluocortolon. Inauguraldissertation Universität München 1971.
8. BLICHERT-TOFT,B. and M.BLICHERT-TOFT: Adrenocortical function in the aged, assessed by the rapid corticotrophin test (Synacthen). Acta endocr. 64, 410 (1970).
9. BREUER,H. und L.NOCKE: Anwendung von Radioisotopen in der Analytik und bei Stoffwechseluntersuchungen von Steroidhormonen. Dt. Ges. f. klin. Chemie Mitteilungen 3/1971.
10. BRUNELLI,B.: Sulla funzione veicolante delle proteine plasmatiche per l'ormone folliculare. Arch. int. Pharmacodyn. 49, 262 (1934).
11. BURKE,C.W.: Accurate measurement of steroid-protein binding by steady state gel filtration. Biochim. Biophys. Acta 176, 403 (1969).
12. BUSH,I.E.: The physiochemical state of cortisol in blood.
In: Hormons in blood
Ciba Found. Colloq. Endocrinol.,
Vol.11, Eds. Wolstenholme,G.E.W. and E.C.P. Millar.
Boston: Little, Brown and Co. (1957)
p.263.

13. DAUGHADAY, W.H.: Evidence for two corticosteroid binding systems in human plasma.
J. lab. clin. Med. 48, 799 (1956a).
14. DAUGHADAY, W.H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins.
I. Dialysis equilibrium and renal clearance studies.
J. clin. Invest. 35, 1428 (1956b).
15. DAUGHADAY, W.H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins.
II. Paper electrophoresis and equilibrium paper electrophoresis.
J. clin. Invest. 35, 1434 (1956c).
16. DAUGHADAY, W.H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins.
IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding protein.
J. clin. Invest. 37, 519 (1958c).
17. DAUGHADAY, W.H.: Steroid protein interaction.
Physiol. Rev. 39, 885 (1959).
18. DAUGHADAY, W.H. and J.K. MARIZ: The binding of steroid hormones by plasma proteins.
In: Biological activities of steroids in relation to cancer.
Ed: G. Pincus and I.P. Vollmer
New York: Academic Press p.61 (1960).
19. DE MOOR, P., K. HEIRWEGH, J. HEREMANS and M. DECLERCK-RASKIN: Proteinbinding of corticoids studied by gel filtration.
J. clin. Invest. 41, 816 (1962).

20. DE MOOR, P.: The binding of radiocortisol on transcortin as measured by gel-filtration. *Pflügers Arch. ges. Physiolog.* 285, 349 (1965).
21. DE MOOR, P., O. STEENO, J. BROSENS and H. HENDRIX: Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration. *J. clin. Endocr.* 26, 71 (1966).
22. DETERMANN, H.: *Gelchromatographie*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
23. DE VENUTO, F., P. C. KELLEHER and U. WESTPHAL: Interactions between corticosteroids and fractions of rat liver and muscle cells as determined by "equilibrium fractionation" and equilibrium dialysis. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 63, 434 (1962).
24. DOE, R. P., R. N. FERNANDEZ and U. S. SEAL: Measurement of corticosteroid binding globulin in man. *J. clin. Endocr.* 24, 1029 (1964).
25. DOE, R. P., F. N. LOHRENZ and U. S. SEAL: Familial decrease in corticosteroid binding globulin. *Metabolism* 14, 940 (1965).
26. EIK-NES, K. and L. D. CLARK: Diurnal variation of plasma 17-hydroxycorticosteroids in subjects suffering from severe brain damage. *J. clin. Endocrinol. and Metabolism* 18, 764 (1958).

27. EKINS, R. and B. NEWMAN: Theoretical aspects of saturation analysis.
Transactions of the 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Steroid assay by protein binding, Geneva, March 1970.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. No. 147, 122 (1970).
28. FARESE, R. V. and J. E. PLAGER: The in vitro red cell uptake of ^{14}C -cortisol; studies of plasma protein binding of cortisol in normal and abnormal states.
J. clin. Invest. 41, 53 (1962).
29. FELDMANN, H. and D. RODBARD: Statistical aspects of radioimmunoassay.
In: Principles of Competitive Protein Binding Assay, Chapter VII.
Eds.: W. D. Odell, W. H. Daughaday, Philadelphia and Toronto: J. B. Lippincott Company (1971).
30. FRASER, R. and V. H. T. JAMES: Double isotope assay of aldosterone and cortisol in human peripheral plasma.
J. Endocr. 40, 59 (1968).
31. GELOTTE, B.: Studies on gel filtration: Sorption properties of the bed material Sephadex.
Journal of Chromatography 3, 330 (1960).

32. GRAY, C.H., J.M. GREENAWAY and N.J. HOLNESS:
The Corticosteroids.
In: Hormons in blood.
Eds: C.H. Gray and A.L. Bacharach, New
York, London: Academic Press p. 439 (1961).
33. HAMOLSKY, M.W., A. GOLDETZ and A.S. FREEDBERG: The plasma
protein-thyroid hormone complex in man.
Further studies on the use of the in
vitro red blood cell uptake of ^{131}JL -
triiodothyronine as a diagnostic test
of the thyroid function.
J. clin. Endocr. 19, 103 (1959).
34. HEYNS, W., H. VAN BADEN and P. DE MOOR: Study of steroid-
protein binding by means of competi-
tive adsorption:
application to cortisol binding in
plasma.
Clin. chim. Acta 18, 361 (1967).
35. HOCHHEUSER, W., F. MARGUTH, M. MÜLLER-BARDORF, K. SCHWARZ,
P.C. SCRIBA und H. THIELE: Diagnostische
Bedeutung der Proteinbindung von Plas-
macortisol, bestimmt durch Dextran-Gel-
filtration.
Klin. Wschr. 47, 300 - 309 (1969).
36. HOFFMANN, W. and U. WESTPHAL: Steroid-protein interac-
tions. XXII Extrapolation technique
for determination of corticosteroid-
binding globulin by gel filtration.
Analyt. Biochem. 32, 48 (1969).

37. HORN,K., J.HENNER und P.C.SCRIBA: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik.
II. Automatisierter T_3 -in vitro Test
Dtsch. Ges. Klin. Chem. 2, 29 (1971).
38. HORN,K., T.RUHL und P.C.SCRIBA: Semiautomatic method for the separation and determination of total triiodothyronine and thyroxine in serum.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 10, 99 (1972).
39. JOHANSSON,E.D.B.: Progesteron levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique.
Acta Endocr. 61, 592 (1969a).
40. ITURZAETA,N.F., D.A.HILLMAN and E.COLLE: Measurement of plasma cortisol in children and adults: A comparison of the double isotope derivate assay, competitive protein binding assay and the modified competitive protein binding analysis.
J. clin. Endocr. 30, 185 (1970).
41. KÖBBERLING,J. und A.v.z.MÜHLEN: Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Plasmacorticoide mit der Proteinbindungsmethode.
Z. klin. Chem. u. Biochem. 2, 67 (1972).
42. KNAPPE,G. und F.STAHL: Ergebnisse eines intravenösen ACTH-Schnelltestes bei der Diagnostik der Nebennierenrindeninsuffizienz.
Endokrinologie 59, 307 (1972).

43. LABHART, A.: Klinik der inneren Sekretion.
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg -
New York, p. 293 f (1971).
44. LABRIE, F., G. PELLETRIER, J. P. RAYNAUD, P. DUCOMMUN and
C. FORTIER: Xème Réunion des Endocrinolo-
gistes de Langue Française.
Métabolisme périphérique et transport
humoral des hormones thyroïdiennes et
stéroïdes.
Paris Doin et Masson 115 (1969).
45. LIDDLE, G. W., D. ISLAND and C. K. MEADER: Normal and
abnormal regulation of corticotropin
secretion in man.
Recent Prog. Hormon Res. 18, 125 (1962).
46. MARSCHNER, I., F. ERHARDT und P. C. SCRIBA: The calculation
of the radioimmunoassay standard curve
by "spline function".
IAEA
Symposium on radioimmunoassay and re-
lated procedures in clinical medicine
and research.
Istanbul (1973) Abstract.
47. MATSUI, N. and J. E. PLAGER: In vitro physiological acti-
vity of protein bound and unbound
cortisol.
Endocrinology 78, 1159 (1966).
48. MAYNARD, D. E., R. L. FOLK, T. R. RILEY, R. G. WIELAND,
G. GWINUP and T. R. HAMWI: A rapid test
for adrenocortical insufficiency.
Ann. of Int. Med. 64, 522 (1966).

49. MIDGLEY, A.R., G.D. NISWENDER and R.W. REBAR: Principles of the assesment of the reliability of radioimmunoassay methods. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Vol. I: Immunoassay of gonadotropins. Ed: E. Diczfalusy. Acta endocr. (Kbh.) 62, Suppl. 142, 163 (1969).
50. MIGEON, C.J., F.H. TYLER, J.P. MAHONEY, H.A. FLORENTIN, H. CASTLE, E.L. BLISS and L.T. SAMUELS: The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion of 17- hydrox- corticosteroids in normal subjects, night workers and blind subjekts. J. clin. Endocr. 16, 622 (1956).
51. MILLIS, I.H., P.S. CHEN and F.C. BARTER: The protein-binding of steroids as studied by ultrafiltration. J. Endocr. 18, XXX (1959).
52. MIKHAIL, G., M. FERIN and R.L. VANDE WIELE: Radioimmuno- assay of estrone and estradiol. Steroids 15, 333 (1970b).
53. MULDOON, T.G.: Isolation and characterization of the corticosteroid-binding globulin (transcortin) from human plasma. University of Lousville: Doctoral dissertation 1967.
54. MULDOON, T.G. and U. WESTPHAL: Steroid-protein inter- actions. XV. Isolation and characterization of corticosteroid-binding globulin from human plasma. J. biol. Chem. 242, 5636 (1967).

55. MÜLLER-BARDORFF, M.: Funktionsuntersuchung der menschlichen Nebenniere mit Hilfe der Bestimmung der sog. 11-OHCS und der Cortisol Bindungsverhältnisse im Plasma.
Inauguraldissertation Universität München 1968.
56. MURPHY, B.E.P. and C.J.PATTEE: A study of the binding capacity of corticosteroid-binding globulin in plasma.
J. clin. Endocr. 23, 459 (1963).
57. MURPHY, B.E.P., A.B.HOOD and C.J.PATTEE: Clinical studies utilizing a new method for the serial determination of plasma corticoids.
Canad. Med. Ass. J. 90, 775 (1964).
58. MURPHY, B.E.P. and C.J.PATTEE: Determination of plasma corticoids by competitive protein binding analysis using gel-filtration.
J. clin. Endocr. 24, 919 (1964).
59. MURPHY, B.E.P.: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in the body fluids by competitive protein-binding radioassay.
J. clin. Endocr. 27, 973 (1967).
60. MURPHY, B.E.P.: Protein binding and the assay of non antigenic hormones.
Rec. Progr. Hormone Res. 25, 563 (1969).

61. MURPHY, B.E.P.: Methodological problems in competitive protein-binding techniques. The use of Sephadex column chromatography to separate steroids.
Transactions of the 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology.
Steroid Assay by protein binding, Geneva, March 1970.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. No. 147, 39 (1970).
62. MURPHY, B.E.P.: Sephadex column chromatography as an adjunct to competitive protein-binding assay of steroids.
Nature New Biology Vol. 232 July 7, 1971
63. MURPHY, B.E.P.: Hormon assay using binding proteins in blood.
In: Principles of Competitive Protein-Binding Assays, Chapter V.
Eds: W.D.Odell, W.H.Daughaday
Philadelphia and Toronto: J.B.Lippincott Company (1971).
64. NABORS, C.J., D.K.MAHAJAN and C.D.WEST: Measurement of plasma corticosterone (CPD.B) levels in man by radioimmunoassay.
50th Ann. Meeting, Endocr. Soc.
Chicago, (1973) Abstract.
65. NAKAJIMA, H., M.MURATA, M.NAKATA, T.NARUSE and S.KUBO:
Determination of blood corticoids using the in vitro resin uptake of ³H-prednisolone.
Acta endocr. 57, 23 (1968).

66. NEWSOME, H.H., A.S.CLEMENTS and E.H.BORUM:
The simultaneous assay of cortisol,
corticosterone, 11-desoxycortisol,
and cortisone in human plasma.
J. clin. Endocr. 34, 473 (1972).
67. NUGENT, C.A. and D.M.MAYES: Plasma corticosteroids
determined by the use of corticosteroid-
binding globulin and dextran-coated
charcoal.
J. clin. Endocr. 26, 1116 (1966).
68. PEARLMAN, W.H. and O.CREPY: Steroid-protein interaction
with particular reference to testosterone
binding by human serum.
J. biol. Chem. 242, 182 (1967b).
69. PETERSON, R.E.: The miscible pool and turnover rate of
adrenocortical steroids in man.
Rec. Progr. Hormone Res. 15, 231 (1959).
70. PINCUS, G.: A diurnal rhythm in the excretion of
urinary ketosteroids by young men.
J. clin. Endocr. 3, 195 (1943).
71. RAPKIN, E.: Determination of counting efficiency
for liquid scintillation spectrometry.
Picker Nuclear: Laboratory Scintillator
Volume 11/No. 12 (1966).
72. RODBARD, D. and J.E.LEWALD: Computer analysis of radio-
ligand assay and radioimmunoassay data.
Acta Endocr. Suppl. 147, 64 (1970).
73. SANDBERG, A.A.: The influence of extra-adrenal factors
on blood corticosteroids.
In: Hormons in Human Plasma, Section 3
Ed: H.N.Antoniades
Boston (Mass) Little, Brown and Co. (1960)

74. SCHELLMANN, J., A.R.LUMRY and L.T.SAMUELS: The binding of uncharged molecules to proteins. II. Testosterone and bovine serum albumin. J. Amer. chem. Soc. 76, 2808 (1954).
75. SCRIBA, P.C., A.C.GERB, F.KLUGE, N.BOSS und O.A.MÜLLER: Eine verbesserte fluorimetrische Serumcortisolbestimmung. Z. Anal. Chem. 252, 284-287 (1970).
76. SCRIBA, P.C. und O.A.MÜLLER: Cortisol im Serum (fluorimetrisch). In: Methoden der Hormonbestimmungen Hrsg.: H.Breuer, H.L.Krüskenper Thieme Verlag, Stuttgart, in Vorbereitung.
77. SEAL, U.S. and R.P.DOE: Purification and properties of transcortin, the cortisol binding globulin from patients with cancer of the prostate. Cancer Chemother. Rept. 16, 329 (1962a).
78. SEAL, U.S. and R.P.DOE: Vertebrate distribution of corticosteroid-binding globulin and some endocrine effects on concentration. Steroids 5, 827 (1965).
79. SEAL, U.S. and R.P.DOE: Corticosteroid binding globulin. Biochemistry, physiology and phylogeny. In: Steroid dynamics. Eds: G.Pincus, T.Nakao and J.F.Tait New York London: Academic Press 1966, p. 63.
80. SJÖVALL, J., J.A.GUSTAFSSON and A.STENBERG: Liquid-gel chromatography of steroids on hydrophobic Sephadex derivatives. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 155, 97 (1971).

81. SLAUNWHITE, W.R. and A.A.SANDBERG: Transcortin:
A corticosteroid-binding protein of
plasma.
J. clin. Invest. 38, 384 (1959).
82. SLAUNWHITE, W.R.Jr., G.N.LOCKIE, N.BACK and
A.A.SANDBERG: Inactivity in vivo of
transcortin bound cortisol.
Science 135, 1062 (1962).
83. SLAUNWHITE, W.R.Jr., S.SCHNEIDER, F.C.WISSLER and
A.A.SANDBERG: Transcortin: A corti-
costeroid-binding protein of plasma.
IX. Isolation and characterization.
Biochemistry 5, 3527 (1966).
84. SLAUNWHITE, W.R. and A.A.SANDBERG: Analysis of corti-
costeroids
Karolinska Symposia of Research Methods
in Reproductive Endocrinology
Vol.II: Steroid Assay by Competitive
Protein Binding
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 147, 144
(1970).
85. SPENCER-PEET, J., J.R.DALY and V.SMITH: A simple method
for improving the specificity of the
fluorimetric determination of the
adrenal corticosteroids in human plasma.
J. Endocr. 31, 235 (1965).
86. STEENO, O. and P.DE MOOR: The corticosteroid-binding
capacity of plasma transcortin in
mammals and aves.
Bull. Soc. Roy. Zool. d'Anvers, Bulletin
No. 38, p.3 (1966).

87. UPTON,G.V. and P.K.BONDY: The binding of cortisol by plasma protein.
Arch. Biochem. 78, 197 (1958).
88. WEBER,CH.: Über den Synacthen-Kurztest.
Praxis 58, Nr. 27, 861 (1961).
89. WESTPHAL.U.: Steroid-protein interactions.
Monographs on Endocrinology, Volume 4
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York (1971).
90. WOOD,J.B., A.W.FRANKLAND, V.H.T.JAMES and J.LANDON:
A rapid test of adrenocortical
function.
Lancet 243 (1965).
91. YALOW,R.S. and S.A.BERSON: Immunoassay of endogenous
plasma insulin in man.
J. clin. Invest. 39, 1157 (1960).
92. YALOW,R.S. and S.A.BERSON: Introduction and general
considerations.
In: Principles of Competitive Protein-
Binding Assay, Chapter I.
Eds: W.D.Odell, W.H.Daughaday
Philadelphia and Toronto: J.B.Lippincott
Company (1971).

LEBENS LAUF

Am 29. September 1948 wurde ich, Johann Braun, als Sohn des Forstamtmanns Alfons Braun und dessen Ehefrau Maria, geb. Wendl in Pleystein/Opf. geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule und trat 1958 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Johannes Kepler-Gymnasium in Weiden ein. Nach der Reifeprüfung im Juni 1967 begann ich im Wintersemester 1967/68 an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen mit dem Medizinstudium. Im Juli 1968 legte ich den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung und im März 1970 die ärztliche Vorprüfung ab.

Mit dem Anfang des Sommersemesters 1970 wechselte ich an die Ludwig-Maximilians Universität München. Vom Herbst 1970 bis zum Sommer 1972 führte ich im Labor für experimentelle Endokrinologie an der II. Med. Klinik der Universität die Versuche zu dieser Dissertation durch. Am 27. Juni 1973 beendete ich die ärztlichen Prüfungen an der Universität München. Ab 1. Oktober 1973 bin ich an der II. Med. Klinik der Universität als Medizinalassistent tätig.

